



# Implication de l'interleukine-18 dans la cytotoxicité anti-tumorale des polynucléaires éosinophiles

Solène Gatault

## ► To cite this version:

Solène Gatault. Implication de l'interleukine-18 dans la cytotoxicité anti-tumorale des polynucléaires éosinophiles. Médecine humaine et pathologie. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2015. Français. NNT : 2015LIL2S004 . tel-01240760

**HAL Id: tel-01240760**

**<https://theses.hal.science/tel-01240760>**

Submitted on 9 Dec 2015

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**ECOLE DOCTORALE BIOLOGIE-SANTE DE LILLE**

**THESE**

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE 2**

**Spécialité : Immunologie**

Présentée et soutenue publiquement par

**Solène GATAULT**

le 12 février 2015

**Implication de l'interleukine-18  
dans la cytotoxicité anti-tumorale des polynucléaires  
éosinophiles**

Membres du Jury

Pr. Lionel Prin, <i>Université de Lille</i>	Président
Dr. Loïc Dupré, <i>Université de Toulouse</i>	Rapporteur
Dr. Valérie Gouilleux-Gruart, <i>Université de Tours</i>	Rapporteur
Dr. Jean-Emmanuel Kahn, <i>Université de Versailles Saint Quentin en Yvelines</i>	Examineur
Dr. Hans Yssel, <i>Université Paris- Sorbonne</i>	Examineur
Pr. Monique Capron, <i>Université de Lille</i>	Directeur de thèse

U995 – LIRIC (Lille International Research of Inflammation Center)

Equipe 1 : « Pathologies inflammatoires digestives : physiopathologie et nouvelles cibles  
thérapeutiques. »

# REMERCIEMENTS

## *A Madame le professeur Monique Capron*

Je vous remercie de m'avoir accueillie au sein de votre équipe et de m'avoir permis d'effectuer cette thèse dans les meilleures conditions. Merci de m'avoir fait confiance, de m'avoir toujours poussé à aller plus loin, de vos conseils toujours pertinents et de votre soutien. Je n'aurais pas pu espérer meilleure directrice de thèse. Soyez assurée de mon plus profond respect et de ma gratitude.

## *A Monsieur le professeur Lionel Prin*

Je vous remercie sincèrement d'avoir accepté de juger ce travail et de présider ce jury. Par vos réflexions scientifiques et votre gentillesse, vous côtoyer au sein de votre laboratoire fût réellement un plaisir.

## *A Madame et Monsieur les Docteurs Gouilleux-Gruart et Dupré*

Je vous remercie d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce jury. Merci infiniment pour l'investissement dont vous avez fait preuve, tous les ans, lors des mes comités de suivi de thèse. Vos remarques et vos conseils m'ont permis d'avancer, je l'espère, dans la bonne direction.

## *A Messieurs les Docteurs Jean-Emmanuel Kahn et Hans Yssel*

Je vous remercie d'avoir accepté de juger ce travail et d'ainsi, me faire partager votre expertise et votre savoir.

## *A l'équipe du « cinquième centre »*

Je souhaite remercier particulièrement Marie et Sylvie sans qui ce travail n'aurait jamais pu se faire. Vous êtes les meilleures collègues !

Je souhaiterais bien évidemment remercier toutes les autres personnes qui ont contribué à ce travail soit directement soit indirectement par votre soutien et votre amitié. Vous vous reconnaitrez !

# TABLE DES MATIERES

<b>TABLE DES MATIERES .....</b>	<b>I</b>
<b>ABREVIATIONS.....</b>	<b>III</b>
<b>LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX .....</b>	<b>V</b>
<b>RESUME .....</b>	<b>VII</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>VIII</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
<b>I. LES POLYNUCLEAIRES EOSINOPHILES .....</b>	<b>1</b>
1. <i>Ontogénie</i> .....	1
2. <i>Morphologie</i> .....	3
3. <i>Recrutement des éosinophiles</i> .....	5
3.1. Localisation .....	5
3.2. Molécules d'adhérence .....	5
3.3. Les chimiokines et leurs récepteurs .....	7
3.4. Recrutement en condition homéostatique.....	8
3.5. Recrutement en conditions inflammatoires.....	8
4. <i>Les fonctions des éosinophiles</i> .....	9
4.1. Rôle dans l'immunité innée .....	10
4.2. Rôle dans l'immunité adaptative .....	11
4.3. Fonctions cytotoxiques .....	12
4.4. Fonctions immunorégulatrices.....	16
4.5. Fonctions de réparation et de remodelage tissulaire .....	18
5. <i>Rôle des éosinophiles en pathologie</i> .....	20
5.1. Asthme.....	21
5.2. Syndromes Hyper-Eosinophiles.....	21
5.3. Maladies Inflammatoires Chronique de l'Intestin (MICI) .....	24
5.4. Tumeurs.....	24
<b>II. L'INTERLEUKINE-18.....</b>	<b>26</b>
1. <i>Production de l'IL-18</i> .....	27
1.1. Cellules productrices d'IL-18 .....	27
1.2. Clivage de l'IL-18 .....	27
2. <i>Signalisation et régulation de l'IL-18</i> .....	29
2.1. Le récepteur de l'IL-18.....	29
2.2. L'IL-18 Binding Protein (IL-18BP).....	31
3. <i>Fonctions biologique de l'IL-18</i> .....	31
3.1. L'IL-18 : une cytokine immuno-régulatrice .....	31
3.2. Augmentation de l'activité cytotoxique .....	34
3.3. IL-18 et éosinophiles .....	34

4.	<i>IL-18 et tractus gastro-intestinal</i> .....	34
4.1.	Homéostasie intestinale .....	35
4.2.	Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin .....	35
4.3.	Cancer colorectal .....	37
III.	IMMUNITÉ ANTI-TUMORALE ET EOSINOPHILES .....	38
1.	<i>Généralités</i> .....	38
1.1.	Arguments épidémiologiques, cliniques et expérimentaux.....	39
1.2.	Effecteurs immunologiques .....	39
2.	<i>Implication des éosinophiles dans l'immunité anti-tumorale</i> .....	42
2.1.	Conséquences anatomo-pathologies des TATs .....	42
2.2.	Recrutement des éosinophiles aux sites tumoraux .....	46
2.3.	Propriétés tumoricides des éosinophiles .....	48
2.4.	Le concept d'Allergo-Oncologie .....	52
2.5.	Eosinophiles, IL-18 et cancer du côlon.....	55
	<b>OBJECTIFS DU TRAVAIL</b> .....	<b>56</b>
	<b>MATÉRIELS ET MÉTHODES</b> .....	<b>58</b>
	<b>RÉSULTATS</b> .....	<b>65</b>
I.	PARTIE I : CARACTÉRISATION DE LA CYTOTOXICITÉ ANTI-TUMORALE DES EOSINOPHILES HUMAINS .....	65
1.	<i>Variation de la cytotoxicité des éosinophiles humaines selon la cible tumorale</i> .....	65
2.	<i>Variation de la cytotoxicité des éosinophiles selon le statut du donneurs</i> .....	67
3.	<i>La cytotoxicité vis-à-vis des Colo-205 est temps et concentration-dépendante</i> .....	68
4.	<i>ICAM-1 et JAM-A sont nécessaires au contact entre les Colo-205 et les éosinophiles</i> .....	71
5.	<i>Adhérence et hétérogénéité fonctionnelle des éosinophiles</i> .....	73
II.	PARTIE II : ACTIVATION DES EOSINOPHILES PAR L'IL-18 .....	75
1.	<i>Les éosinophiles humains expriment l'IL-18R</i> .....	75
2.	<i>Activation par l'IL-18 : libération de ROS et de protéines cationiques</i> .....	76
3.	<i>Activation par l'IL-18 : libération d'IFN<math>\gamma</math> et expression de FasL</i> .....	78
III.	IMPLICATION DE L'IL-18 DANS LA CYTOTOXICITÉ ANTI-TUMORALE DES EOSINOPHILES .....	80
1.	<i>L'IL-18 est sur-exprimée dans les éosinophiles en contact avec les colo-205</i> .....	80
2.	<i>L'IL-18 contribue à la cytotoxicité des éosinophiles vis-à-vis des Colo-205</i> .....	81
3.	<i>L'IL-18 n'induit pas directement la mort des Colo-205</i> .....	83
4.	<i>L'IL-18 est impliquée dans l'adhérence entre éosinophiles et Colo-205</i> .....	84
5.	<i>L'IL-18 régule CD11a et ICAM-1</i> .....	85
6.	<i>Les éosinophiles expriment l'inflammasome NLRP3</i> .....	87
IV.	CONCLUSION DE LA PARTIE EXPÉRIMENTALE .....	88
	<b>DISCUSSION ET PERSPECTIVES</b> .....	<b>90</b>
	<b>CONCLUSION</b> .....	<b>105</b>
	<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....	<b>107</b>
	<b>ANNEXES</b> .....	<b>132</b>

## ABBREVIATIONS

**ADCC:** Antibody Dependent Cell mediated Cytotoxicity  
**ADN:** Acide Désoxyribonucléique  
**AOM :** Azoxyméthane  
**ARN:** Acide Ribonucléique  
**ASC :** Caspase-1 adaptor protein  
**ATP :** Adénosine Triphosphate  
**CAC :** Cancer Associé à une Colite  
**CD :** Cluster de Différenciation  
**CMH :** Complexe Majeur d’Histocompatibilité  
**CPA:** Cellules Présentatrices des Antigènes  
**DSS:** Dextran Sodium Sulfate  
**DAMP:** Damage Associated Molecular Pattern  
**ECP:** Eosinophil Cationic Protein  
**EDN:** Eosinophil Derived Neurotoxin  
**EPO:** Eosinophil Peroxidase  
**FcR :** Récepteur des fragments Fc  
**GM-CSF:** Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor  
**ICAM-1:** Intracellular Cell Adhesion Molecule – 1  
**IFN:** Interféron  
**Ig:** Immunoglobuline  
**IL-:** Interleukine  
**IL-18BP:** IL-18 Binding Protein  
**IP :** Iodure de Propidium  
**LPS :** Lipo-Poly-Saccharide  
**MBP:** Major Basic Protein  
**MC:** Milieu de culture  
**MICI:** Maladies Inflammatoires Chronique de l’Intestin  
**MGG:** May-Grünwald Giemsa  
**NK:** Natural Killer  
**NLR:** Nod-Like Receptor  
**PAMP:** Pathogen Associated Molecular Pattern  
**PAR:** Protease Activated Receptor  
**pI:** Point Isoélectrique  
**RCH:** Recto-Colite Hemorragique

**RNase:** Ribonucléase

**ROS:** Reactive Oxygen Species

**SNAP:** Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment Protein

**SNARE:** SNAP Receptor

**TATE:** Tumor Associated Tissue Eosinophilia

**TCR:** T cell Receptor

**TGF:** Tumor Growth Factor

**TLR:** Toll Like Receptor

**TNF:** Tumor Necrosis Factor

**TSLP:** Thymic Stromal Lymphopoietin

**VAMP:** Vesicle Associated Membrane Protein

**WT :** Wild Type

## LISTE DES FIGURES et TABLEAUX

Figure 1 : Effets combinatoires des facteurs de transcription impliqués dans l'engagement et dans la différenciation terminale de la lignée éosinophile. ....	2
Figure 2 : Expression temporelle des facteurs de transcription durant la différenciation des éosinophiles. ....	3
Figure 3 : Morphologie de l'éosinophile mature. ....	4
Figure 4 : Molécules de surface exprimées par l'éosinophile. ....	6
Figure 5 : Médiateurs libérés par les éosinophiles ....	9
Figure 6 : Mécanismes de dégranulation des éosinophiles ....	14
Figure 7 : Modulation des fonctions des leucocytes par les éosinophiles. ....	17
Figure 8 : Représentation schématique de la « LIAR hypothesis » et de ses conséquences en homéostasie ou pathologie. ....	19
Figure 9 : Tableau décisionnel au diagnostic et traitement des éosinophilies ....	23
Figure 10 : Structure de l'inflammasome et production de l'IL-18 active. ....	28
Figure 11 : Signalisation de l'IL-18 ....	30
Figure 12 : Immuno-modulation de l'IL-18 ....	32
Figure 13 : Concept d'immunoediting. ....	38
Figure 14 : Leucocytes impliqués dans l'immunité anti-tumorale. ....	40
Figure 15: Représentation histologique des TATEs. ....	43
Figure 16 : Stratégie de gating des tests de cytotoxicité ....	59
Figure 17 : Différence fonctionnelle des éosinophiles humains selon la cible tumorale. ....	66
Figure 18 : Différence fonctionnelle des éosinophiles selon le statut des donneurs. ....	68
Figure 19 : Temps- et concentration-dépendance de la cytotoxicité des éosinophiles vis-à-vis des Colo-205. ....	70
Figure 20 : Expression de ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3 et JAM-A au sur les Colo-205. ....	72
Figure 21 : Implication d'ICAM-1 et de JAM-A dans l'adhérence et la cytotoxicité des éosinophiles. ....	73
Figure 22 : Rôle de l'adhérence dans l'hétérogénéité fonctionnelle des éosinophiles. ....	74
Figure 23 : Présence de l'IL-18R à la membrane des éosinophiles ....	75



Figure 24 : Libération de ROS et de protéines cationiques après stimulation des éosinophiles par l'IL-18 .....	77
Figure 25 : Libération d'IFN $\gamma$ et expression de FasL par les éosinophiles.....	78
Figure 26 : Expression de l'IL-18 dans les éosinophiles et les Colo-205.....	81
Figure 27 : Implication de l'IL-18 dans la cytotoxicité des éosinophiles .....	82
Figure 28 ; Effet direct de l'IL-18 sur de la mort cellulaire des Colo-205 .....	84
Figure 29 : L'IL-18 participe au contact entre éosinophiles et Colo-205.....	85
Figure 30 : L'IL-18 régule positivement l'expression d'ICAM-1 et de CD11a.....	86
Figure 31 : Présence de l'inflammasome NLRP3 dans les éosinophiles humains.....	87
Figure 32 : Schéma récapitulatif de la partie expérimentale.....	89
Figure 33 : Activation des inflammasomes.....	103

Tableau 1 : Rôle des protéines cationiques de l'éosinophile .....	12
Tableau 2 : Rôle des éosinophiles en pathologie .....	20
Tableau 3 : Principaux modèles murins génétiquement modifiés utilisés pour l'étude des éosinophiles .....	25
Tableau 4 : Nomenclature et principales fonctions de membres de la famille de l'IL-1 .....	26
Tableau 5 : Liste des anticorps utilisés pour la cytométrie en flux .....	61
Tableau 6 : Séquences des primers .....	63

## RESUME

Les polynucléaires éosinophiles sont des leucocytes multifonctionnels qui participent à la réponse innée et adaptative par l'expression et la sécrétion de nombreux récepteurs et médiateurs. De plus en plus d'études, épidémiologiques, *in vivo* ou *in vitro*, suggèrent la participation des éosinophiles dans l'immunité anti-tumorale, et notamment dans le contexte du cancer du côlon. En effet, la présence d'une TATE (Tumor-Associated Tissue Eosinophilia) chez les sujets atteints de cancers est, en général, associée à un pronostic favorable. De même, notre laboratoire ainsi que d'autres équipes ont montré que les éosinophiles humains expriment des récepteurs et médiateurs, communs aux lymphocytes et connus pour être impliqués dans l'immunité anti-tumorale, tels que le 2B4, le complexe CD3/TCR $\gamma\delta$  ou le granzyme A. La stimulation des éosinophiles *in vitro*, via ces récepteurs, conduit à la mort de cellules cancéreuses, cet effet nécessitant un contact entre les cellules impliquant LFA-1 sur les éosinophiles.

L'interleukine (IL)-18 est un membre de la famille des cytokines de l'IL-1. Elle fut initialement identifiée comme un facteur induisant la production d'IFN $\gamma$ , basé sur sa capacité à promouvoir une réponse de type Th1 chez les lymphocytes et les cellules NK. Aujourd'hui, l'IL-18 est considérée comme une cytokine immuno-régulatrice capable de stimuler de nombreux types cellulaires. Son implication dans la réponse anti-tumorale est de plus en plus reconnue, notamment en participant à la cytotoxicité des cellules NK. Nous avons donc étudié si cette cytokine pouvait également être impliquée dans la cytotoxicité des éosinophiles.

Dans ce travail, nous avons démontré que les éosinophiles humains exercent une cytotoxicité vis-à-vis de plusieurs lignées cellulaires tumorales avec cependant une certaine hétérogénéité. L'IL-18 est non seulement capable d'activer *in vitro* les éosinophiles mais elle participe également à leur activité anti-tumorale vis-à-vis d'une lignée de carcinome du côlon, les Colo-205, en augmentant notamment le contact entre les deux types cellulaires. Nos résultats proposent l'IL-18 comme un nouveau médiateur dans l'activité anti-tumorale des éosinophiles et apportent un argument supplémentaire en faveur du rôle bénéfique que les éosinophiles peuvent exercer, notamment dans le contexte du cancer du côlon.

## SUMMARY

Eosinophils are multifunctional leukocytes which participate in innate and adaptive immune responses through the expression and secretion of various receptors and mediators. Several epidemiological, as well as *in vivo* and *in vitro* studies suggest the involvement of eosinophils in antitumor immunity, notably in context of colon cancer. In fact, a TATE (Tumor-associated tissue eosinophilia) is associated with a good prognostic value. Recently, we and others have shown that human eosinophils express receptors and mediators shared with lymphocytes and involved in anti-tumor defense, such as 2B4, TCR $\gamma\delta$ /CD3 complex, and granzyme A. Eosinophil stimulation through these receptors induced tumor cell death *in vitro*. This activity required cell-cell contact involving LFA-1 on eosinophils.

IL-18 is a member of the IL-1 family of cytokines. IL-18 was first identified as an IFN $\gamma$ -inducing factor, based on its ability to enhance the Th1-type immune response by stimulating NK cells and T cells. IL-18 is actually considered as an immunoregulatory cytokine able to stimulate various cell types. IL-18 participates in antitumor responses notably by enhancing NK cell-mediated cytotoxicity. In this context, we have studied whether this cytokine may be also involved in eosinophil-mediated cytotoxicity.

In this study, we show that human eosinophils exert cytotoxicity against tumor cells *in vitro*, with heterogeneity according to the type of target cells. IL-18 increases eosinophil-mediated cytotoxicity towards Colo-205, a colon carcinoma cell line *in vitro* by promoting cell-cell contact between these two cell types. Our results propose IL-18 as a new mediator in antitumor properties of human eosinophils and support further evidence that eosinophils could exert a beneficial role, notably in the context of colon cancer.

# INTRODUCTION

## **I. Les polynucléaires éosinophiles**

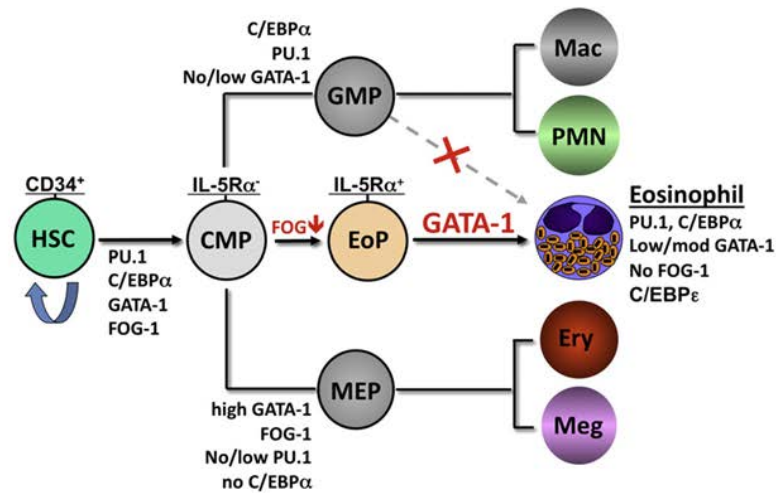
Les polynucléaires éosinophiles furent identifiés pour la première fois en 1879 par Paul Ehrlich qui développa une technique de coloration des cellules sanguines par l'éosine. Ce colorant, capable de se lier aux granules des éosinophiles, permet leur identification par une coloration rose-orangé. Dans cette partie, nous aborderons, dans un premier temps, le développement de ces cellules. Nous nous intéresserons ensuite à leur morphologie particulière, ainsi qu'à leur distribution.

### **1. Ontogénie**

Comme toutes les cellules sanguines, les éosinophiles sont produits dans la moelle osseuse et proviennent de cellules souches hématopoïétiques (CSH), pluripotentes, exprimant le CD34, et communes à toutes les lignées. Sous l'action de plusieurs facteurs de transcription et de cytokines, les CSH vont se différencier en progéniteurs myéloïdes communs (PMC) pluripotents, puis en précurseurs éosinophiles qui poursuivent leur maturation via le GM-CSF, l'IL-3 et l'IL-5 (1,2). Au niveau phénotypique, ce précurseur éosinophile se caractérise donc par l'expression de la chaîne alpha du récepteur à l'IL-5 (IL-5R $\alpha$ ), de l'IL-3R $\alpha$  et du GM-CSF-R $\alpha$ .

Plusieurs facteurs de transcription, faisant partie de trois familles différentes, jouent un rôle majeur dans le développement de la lignée éosinophile : C/EBP $\alpha$  et  $\epsilon$  (CCAAT/enhancer-binding protein family), PU.1 (E-Twenty-Six (ETS) family) et GATA-1 (famille des facteurs à doigt de zinc). Ces facteurs de transcription régulent également les autres lignées hématopoïétiques (3). En effet, la différenciation des macrophages et des polynucléaires neutrophiles est régulée précocement par les facteurs de transcription de la famille des C/EBP et de PU.1. Au contraire, la différenciation des érythrocytes et des mégacaryocytes est régulée par les facteurs GATA et FOG-1 (friend of GATA protein 1) (1). Habituellement, ces facteurs s'antagonisent mutuellement, cependant, les éosinophiles brisent ces règles puisque ces cellules co-expriment ces différents facteurs de transcription (Fig. 1.). L'étude de gènes a permis de montrer que l'engagement dans la lignée éosinophile représente une délicate

balance dans le seuil d'expression de ces facteurs, et qu'une perturbation minimale de cet équilibre peut faire basculer les cellules vers la lignée érythroïde ou myéloïde (4).



**Figure 1 : Effets combinatoires des facteurs de transcription impliqués dans l'engagement et dans la différenciation terminale de la lignée éosinophile.**

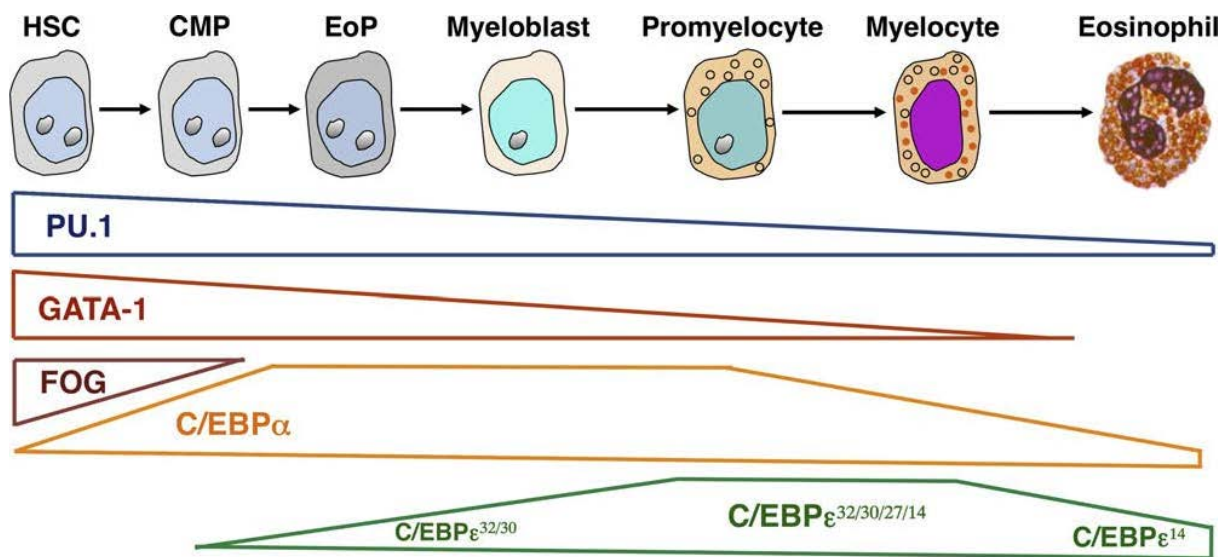
HSC : cellule souche hématopoïétique ; CMP : progéniteur myéloïde commun ; GMP : progéniteur macrophage/granulocyte ; EoP : progéniteur éosinophile ; MEP : progéniteur érythrocyte/mégacaryocyte ; Mac : macrophage, PMN : leucocyte polynucléaire ; Ery : érythrocyte ; Meg : Mégacaryocyte

Figure tirée de Ackerman SJ, Du J. Transcriptional Regulation of Eosinophil Lineage Commitment and Differentiation. 76-89. In Lee JJ, Rosenberg HF. Eosinophils in Health and Disease. 2013.

Une autre variable à prendre en compte est la cinétique d'expression de ces facteurs de transcription. En effet, l'engagement vers les précurseurs éosinophiles nécessite l'expression coordonnée de C/EBPα et de PU-1, un taux modéré de GATA-1 et l'absence de FOG (4). Aux stades plus matures, c'est-à-dire à la transition entre promyélocytes et myélocytes, à la différenciation terminale et à la maturation fonctionnelle, la régulation se fait par les isoformes activateurs et inhibiteurs de C/EBPε, également de façon temps-dépendante (5,6) (Fig. 2).

Concernant les cytokines, l'IL-5, relativement spécifique des éosinophiles par l'expression sélective de la chaîne α de son récepteur, est une cytokine clé dans l'expansion de ces cellules et dans leur survie tissulaire. Des souris transgéniques sur-exprimant l'IL-5 présentent une éosinophilie massive (7). Cependant, un taux normal d'éosinophiles sanguins est retrouvé chez les souris déficientes pour l'IL-5 bien qu'elles ne développent pas d'éosinophilie après infection par des helminthes ou après stimulation allergénique, leur recrutement tissulaire étant aboli (8). De plus, Mori *et al.* ont différencié *in vitro* des éosinophiles matures à partir de progéniteurs de la moelle osseuse en absence d'IL-5 (9). Ces observations suggèrent que la signalisation IL-5/IL-5Rα ne jouerait pas un rôle essentiel dans

l'engagement dans la lignée éosinophile mais donnerait plutôt un signal permissif pour leur différenciation.



**Figure 2 : Expression temporelle des facteurs de transcription durant la différenciation des éosinophiles.**

Taux et temps d'expression des différents facteurs de transcription participant à la différenciation de la lignée éosinophile : PU.1 ; GATA-1 ; FOG ; C/EBP $\alpha$  et C/EBP $\epsilon$ . La régulation négative de FOG pour le passage du progéniteur myéloïde commun (CMP) au progéniteur éosinophile (EoP) est un prérequis pour l'expression des gènes cibles des éosinophiles, régulés par GATA-1. L'expression de GATA-1 cesse dans les éosinophiles sanguins matures.

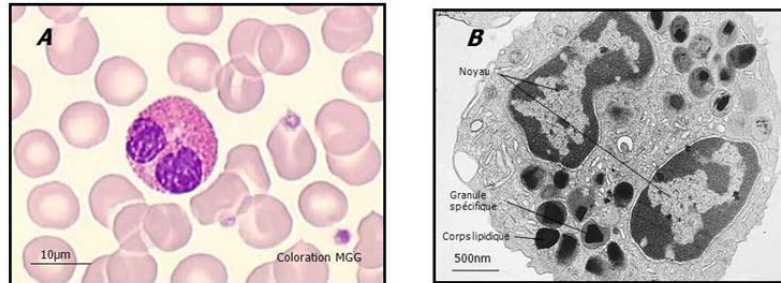
Figure tirée de Ackerman SJ, Du J. Transcriptional Regulation of Eosinophil Lineage Commitment and Differentiation. 76-89. In Lee JJ, Rosenberg HF. Eosinophils in Health and Disease. 2013.

## 2. Morphologie

Les polynucléaires éosinophiles sont facilement différenciables des autres leucocytes. Ils mesurent 8 à 12  $\mu\text{m}$  de diamètre et ont, chez l'Homme, un noyau bilobé et de nombreuses granulations rose-orangé volumineuses et homogènes, observables après coloration classique au May Grünwald Giemsa (MGG) (Fig. 3A.). Toutefois, dans certaines conditions et selon leurs états de maturation et d'activation, des éosinophiles « hypodenses », très peu granuleux et vacuolés peuvent être observés, leur identification est alors moins aisée. Une réaction enzymatique spécifique à la peroxydase (résistante au cyanure), conduisant à un précipité foncé, est alors utilisée pour identifier et déterminer l'état de maturation des éosinophiles.

La microscopie électronique a, quant à elle, permis de visualiser leurs granules spécifiques. Ces granules, dits secondaires, sont bi-compartmentés. Ils comportent un noyau cristalloïde, aussi appelé « core », et une matrice qui apparaît moins dense aux électrons (Fig.

3B.). Ces éléments ultrastructuraux sont une véritable signature des éosinophiles, et sont peut-être encore plus spécifiques que le marquage à l'éosine (10).



**Figure 3 : Morphologie de l'éosinophile mature**

Morphologie après coloration au MGG (A) et en microscopie électronique (B).

Figure tirée de Prin L., Gatault S., Lefèvre G., Kahn JE. Le polynucléaire éosinophile : nouveautés en physiologie et implications diagnostiques. Revue Francophone des Laboratoires. 2014. (Annexe 3)

Les éosinophiles humains matures possèdent quatre types distincts de granules:

- **Les granules primaires**, ronds et denses en microscopie électronique, sont formés à un stade précoce de la différenciation dans la moelle osseuse. Ces granules, contenant la lysophospholipase, ne comportent pas de noyau cristalloïde mais peuvent se condenser pour former des cristaux de Charcot-Leyden.
- **Les granules secondaires** spécifiques, ou granules sécréteurs, permettent le stockage et la sécrétion d'un grand nombre de protéines préformées dont les protéines cationiques des éosinophiles, la MBP (Major Basic Protein), contenue dans le « core » de ces granules, l'EPO (Eosinophil Peroxydase), l'ECP (Eosinophil Cationic Protein) et l'EDN (Eosinophil Derived Neurotoxin), contenues dans la matrice.
- **Les petits granules** sont invisibles en microscopie optique, ils dérivent de l'appareil de Golgi et contiennent des complexes enzymatiques incluant l'aryl sulfatase et la phosphatase acide.
- **Les corps lipidiques**, petites vésicules, sont le site de biosynthèse des médiateurs lipidiques inflammatoires comme les prostaglandines et les leucotriènes.

### **3.Recrutement des éosinophiles**

#### **3.1. Localisation**

Chez un individu sain, les éosinophiles ne représentent qu'entre 1 et 3% des leucocytes circulants (valeur usuelle : 40-500/mm<sup>3</sup>). Après leur maturation dans la moelle osseuse, ils atteignent la circulation sanguine où ils ne restent qu'entre 13 et 18 heures avant de migrer vers les tissus. Cela explique les difficultés d'obtention et de purification d'éosinophiles de sujets sains. A la différence du sang, leur demi-vie dans les tissus est plus longue puisqu'ils peuvent y survivre pendant plusieurs semaines (11). Leur localisation tissulaire est très variée. En effet, à l'état physiologique, on les retrouve au sein des organes lymphatiques et hématopoïétiques, et principalement au niveau des tissus à l'interface avec l'environnement tels que le tractus gastro-intestinal, respiratoire, uro-génital ou encore la peau. Ces tissus constituent des endroits de renouvellement tissulaire important. Il pourrait alors exister un lien entre la présence d'éosinophiles et le remodelage tissulaire homéostatique et/ou la réparation dans les tissus lésés, par exemple au niveau des tumeurs.

En cas de réaction inflammatoire, les éosinophiles sont redistribués et quittent leurs sites : exemple, dans le tractus gastro-intestinal, les éosinophiles résident dans la lamina propria en condition d'homéostasie. Lors d'une situation inflammatoire, ils migrent et sont retrouvés au niveau des plaques de Peyer (12).

#### **3.2. Molécules d'adhérence**

La migration tissulaire nécessite une étape de roulement sur les cellules endothéliales suivie d'une adhérence permettant la transmigration. Deux types de molécules d'adhérence sont nécessaires à ce passage tissulaire: les sélectines et les intégrines.

Les intégrines sont nécessaires au roulement. Les éosinophiles expriment constitutivement la L-sélectine qui interagit avec le CD34 et MAdCAM-1, exprimés par l'endothélium. Ils expriment également le CD162 (P-selectin glycoprotein ligand-1 ou PSGL-1) ainsi que le CD15s (sialyl-Lewis<sup>x</sup>) qui permettent l'interaction avec la P-selectine et la E-selectine de l'endothélium (3) (Fig. 4).

Les intégrines sont des molécules hétérodimériques constituées d'une chaîne  $\alpha$  et d'une chaîne  $\beta$ . L'avidité de la liaison entre l'intégrine et son ligand est plus importante que celle de



la liaison sélectine-ligand, elle permet donc le renforcement de l'adhérence des éosinophiles à l'endothélium. Ceux-ci expriment les intégrines  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  et  $\beta 7$  ( $\alpha 4\beta 1$  (VLA-4 ; CD49d),  $\alpha 6\beta 1$  (VLA-6 ; CD49f),  $\alpha M\beta 2$  (MAC-1 ; CD11b/CD18),  $\alpha L\beta 2$  (LFA-1 ; CD11a/CD18),  $\alpha X\beta 2$ ,  $\alpha D\beta 2$  et  $\alpha 4\beta 7$ ), qui ont pour ligands VCAM-1, ICAM-1, -2, -3, MAdCAM-1 et le fibrinogène (3).

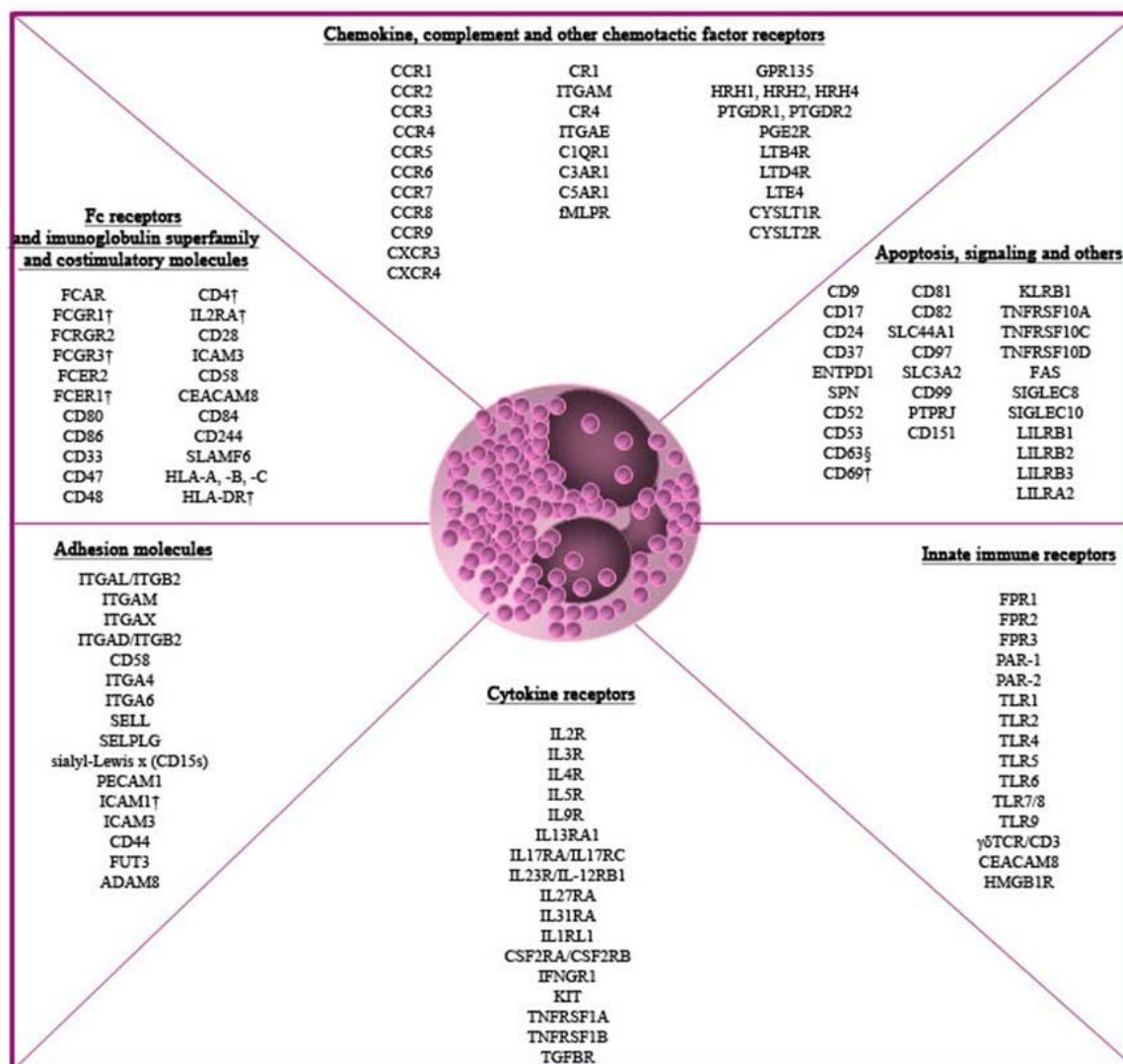


Figure 4 : Molécules de surface exprimées par l'éosinophile.

Figure tirée de Driss V, Legrand F, Capron M. Eosinophil receptor profile. 30-38. In Lee JJ, Rosenberg HF. Eosinophils in Health and Disease. 2013.

### 3.3. Les chimiokines et leurs récepteurs

#### 3.3.1 Récepteurs aux chimiokines

Les intégrines seules ne suffisent pas au recrutement tissulaire des éosinophiles. Ainsi, après la diapédèse trans-endothéliale, ils sont dirigés par des molécules chimiotactiques jusqu'au site d'intérêt. Les chimiokines sont produites par différentes cellules et organes et, en se fixant sur leurs récepteurs, contribuent au tropisme tissulaire des éosinophiles. Ces récepteurs appartiennent à la famille des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G. Les principaux récepteurs présents sur les éosinophiles sont le CCR1 (ayant pour ligand RANTES/CCL5, MIP-1 $\alpha$ /CCL3 et le MCP-3/CCL7) et le CCR3 (se fixant à MCP-4/CCL13, RANTES et l'éotaxine/CCL11) (13). Cependant, sous certaines conditions, les éosinophiles expriment également d'autres récepteurs tels que le CCR2 (se liant à MPC-1/CCL2) ou le CXCR3 qui répond à l'IP-10/CXCL10 (3). Il est à noter qu'il existe une régulation du recrutement des éosinophiles par des mécanismes d'inhibition de ces récepteurs. Par exemple, l'éotaxine est un antagoniste du CXCR3 et les ligands du CXCR3 inhibent la signalisation du CCR3 (14,15) (Fig. 4).

#### 3.3.2 Exemple des éotaxines

Les éotaxines sont une sous-famille de chimiokines qui ciblent spécifiquement les éosinophiles. L'éotaxine(-1) ou CCL11 a été la première décrite. Celle-ci est exprimée constitutivement dans de nombreux tissus, l'expression la plus importante étant retrouvée dans le tractus gastro-intestinal (16). Cela explique que les éosinophiles du tube digestif représentent la population la plus importante de ces cellules, en dehors de la moelle osseuse (16,17). Après challenge antigénique, l'éotaxine permet le recrutement précoce des éosinophiles, alors que l'éotaxine-2, ou CCL24, permet le recrutement plus tardif (18). L'éotaxine-2, ou CCL24, est chimioattractante pour les éosinophiles et les basophiles. Enfin, l'éotaxine-3, ou CCL26, semble 90% moins puissante que l'éotaxine (19). Evidemment, d'autres facteurs induisent également le recrutement, spécifique ou non, des éosinophiles selon le contexte.

### 3.4. Recrutement en condition homéostasique

A l'état physiologique, après maturation dans la moelle osseuse et un bref passage dans la circulation générale, les éosinophiles sont donc recrutés au niveau de nombreux tissus : tractus gastro-intestinal, thymus, glandes mammaires et utérus et participent à leur homéostasie (20). Les éosinophiles retrouvés au niveau du tractus gastro-intestinal forment la population en éosinophiles la plus importante (17). Dans l'intestin, ce recrutement en condition homéostasique est notamment régulé par l'éotaxine-1 (ou CCL11), chimiokine produite par les cellules épithéliales mais également les mastocytes, les macrophages alvéolaires, les cellules endothéliales, les fibres musculaires lisses bronchiques et les éosinophiles eux-mêmes. L'éotaxine, constitutivement exprimée par les organes cités précédemment, agit sur les éosinophiles par son récepteur spécifique, le CCR3 qui est exprimé sur ces cellules. Il est cependant intéressant à noter que l'éotaxine n'est pas le seul ligand de ce récepteur. Il peut également interagir avec, par exemple, RANTES, MCP-2, MCP-3, l'éotaxine-2. Cependant, il semblerait bien que ce soit la liaison CCL11/CCR3 qui soit responsable de la régulation de la localisation des éosinophiles en condition homéostasique (21).

La localisation des éosinophiles varie avec le rythme circadien selon le cycle neuro-endocrinien ou métabolique (22,23). Dans l'intestin, les lymphocytes innés ILC2 co-expriment l'IL-5 et l'IL-13, qui induisent la sécrétion d'éotaxine et le recrutement des éosinophiles. Il est à noter que cette expression augmente lors de la prise alimentaire. Les ILC2 pourrait donc participer également contribuer à la localisation tissulaire dépendante du rythme circadien des éosinophiles (24).

### 3.5. Recrutement en conditions inflammatoires

Au cours des réactions inflammatoires, de nombreux facteurs chimioattractants pour les éosinophiles sont libérés. Ce recrutement se fait sous la dépendance de chimiokines mais également de cytokines, de médiateurs lipidiques et de facteurs du complément. En effet, les éosinophiles expriment des récepteurs pour des facteurs d'attraction non spécifiques comme le PAF (Platelet activating factor), les anaphylatoxines, les alarmines, les leucotriènes et l'histamine (17). La spécificité de ce recrutement se fait par la combinaison des médiateurs libérés par le microenvironnement, des molécules d'adhérence des endothéliums et des

récepteurs présents sur les éosinophiles. Par exemple, durant l'inflammation intestinale, l'expression de l'éotaxine est augmentée (21). De même, l'accumulation des éosinophiles vers l'intestin grêle, en condition inflammatoire, est sous la dépendance de la liaison entre MAdCAM-1 et  $\alpha 4\beta 7$  tandis que leur recrutement au niveau du colon est régulé par la liaison  $\beta 2$ /ICAM-1 (25).

#### 4. Les fonctions des éosinophiles

Les éosinophiles ont longtemps été considérés comme étant seulement des cellules effectrices terminales dans les pathologies allergiques ou les infections parasitaires à helminthes. Cependant, il est maintenant admis que ce sont des cellules multifonctionnelles qui participent à l'initiation et la propagation des réponses inflammatoires, à la régulation des réponses immunitaires ainsi qu'à l'homéostasie tissulaire (26). Ces nombreuses fonctions sont possibles par l'intégration de nombreux stimuli, les éosinophiles ayant à leur surface une multitude de récepteurs, de l'immunité innée ou adaptative (Fig. 4). Cette stimulation conduit à la libération, rapide et sélective, d'une grande variété de cytokines et médiateurs (Fig.5).

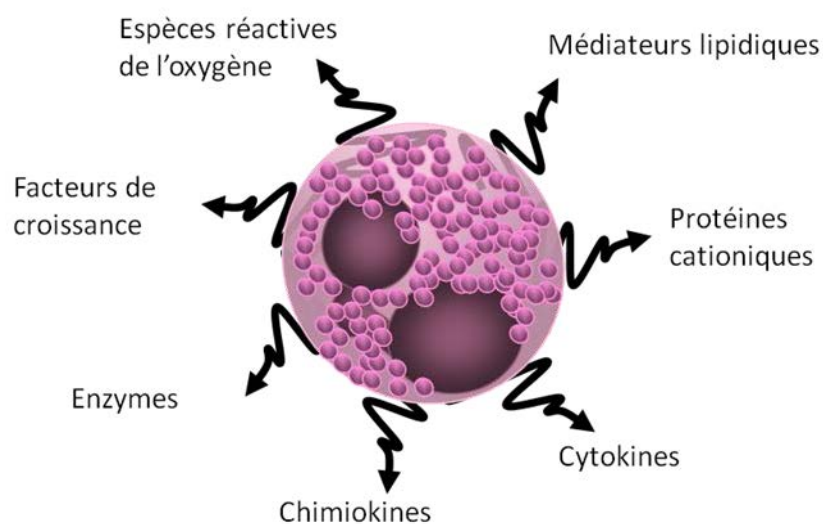


Figure 5 : Médiateurs libérés par les éosinophiles

## 4.1. Rôle dans l'immunité innée

D'un point de vue phylogénétique, des cellules possédant des granules éosinophiliques « Eosinophil Granule Cells » ont été retrouvées chez des organismes évoluant depuis plus de 500 millions d'années. Cela suggère que ces cellules pouvaient participer à des processus fondamentaux de défense innée bien avant l'apparition des processus de réarrangements des gènes nécessaires à la réponse immunitaire adaptative.

### 4.1.1 Récepteurs membranaires

Plusieurs récepteurs permettent aux éosinophiles d'être stimulés directement par des composés environnementaux, par des motifs moléculaires de pathogènes (PAMPs – Pathogen Associated Microbia Patterns) ou encore par des facteurs endogènes (DAMPs – Damage Associated Molecular Patterns ou alarmines) libérés par les cellules nécrotiques ou stressées (27). Les PAMPs et DAMPs peuvent être reconnus par les TLR dont plusieurs ont été mis en évidence sur les éosinophiles (TLR-1, -2, -4, -5, -6, -7, -9) (Fig.4) (28). Cependant, leurs ligands et leurs fonctions restent encore imprécis (29). Nagase et *al.* ont montré que parmi les différents ligands des TLR, seul un ligand du TLR-7 (R-848) est capable d'activer les éosinophiles humains et de déclencher la production d'ions superoxydes (30). Cependant, une autre étude suggère que les éosinophiles pourraient être activés de manière différentielle selon le ligand, aboutissant à l'augmentation de l'expression de certaines molécules d'adhérence (ICAM-1 et CD18) et/ou à la libération de cytokines/chimiokines, superoxydes et protéines granulaires (28). De plus, il a été démontré, dans notre laboratoire, une interaction directe entre le TLR2, présent sur les éosinophiles, et *Mycobacterium bovis* - BCG entraînant la production d'espèces réactives à l'oxygène (ROS), d'EPO et d'alpha-défensines (31).

Certaines protéases issues d'allergènes tels que les acariens (32), les champignons du genre *Alternaria* (33) ou les pollens sont également capables d'activer directement les éosinophiles par clivage de la partie N-terminale des PAR-1 et -2, entraînant la libération de radicaux libres et de leucotriènes (34).

Les éosinophiles possèdent également des récepteurs pour le complément (CR1 et CR3) dont l'activation provoque leur dégranulation (35). De même, des molécules endogènes, libérées par les tissus stressés ou abimés, sont capables d'activer les éosinophiles entraînant leur dégranulation; c'est notamment le cas lors des situations tumorales (26). Par exemple, les

éosinophiles répondent à une stimulation par de l'ATP, de l'acide urique, des alarmines telles que la High Mobility Group Box (HMGB)-1 ou l'IL-33.

Récemment, il a été mis en évidence, dans notre laboratoire, à la surface des éosinophiles humains, la présence d'un récepteur initialement exprimé exclusivement par les lymphocytes T: le complexe CD3/TCR $\gamma\delta$  (36). La présence de ce récepteur représente un véritable lien entre immunité innée et adaptative puisqu'il est capable de se lier à des ligands de l'immunité innée tels que les phosphoantigènes produits par de nombreux pathogènes ou cellules cancéreuses.

#### 4.1.2 Les « traps »

Un autre mécanisme existant chez les éosinophiles et renforçant leur rôle dans l'immunité innée est la libération extrêmement rapide (en moins d'une seconde) de filaments d'ADN. Il est, dans son principe, similaire aux pièges extracellulaires libérés par les neutrophiles, monocytes et mastocytes mais de structure différente (37). Ainsi, ces filaments, appelés EETs (Eosinophils Extracellular Traps), sont constitués d'ADN mitochondrial et de protéines granulaires (ECP, MBP) et forment, une fois libérés dans le milieu extracellulaire, des réseaux entrelacés capables de piéger et de tuer des bactéries et des champignons (38). Les stimuli conduisant à la libération de ces EETs sont le LPS, l'éotaxine, le facteur du complément C5a (38), certaines alarmines comme la TSLP (39), ou encore les cristaux d'acide urique (40).

## 4.2. Rôle dans l'immunité adaptative

Les éosinophiles peuvent être activés par des anticorps qui se lient aux récepteurs des fragments Fc des immunoglobulines IgA, IgE et IgG qu'ils possèdent à leur surface (Fc $\alpha$ R, Fc $\gamma$ RII, Fc $\epsilon$ RI et Fc $\epsilon$ RII) (26,41). Ces récepteurs permettent l'endocytose, l'activation des cellules et leur dégranulation.

Les éosinophiles expriment aussi des molécules du CMH de classe II (Complexe Majeur d'Histocompatibilité), telles que le HLA-DR, ainsi que différentes molécules de co-stimulation (CD86, CD40, CD40L, CD28, CD25), leur conférant le rôle de cellules présentatrices d'antigène et leur permettant ainsi de dialoguer avec les lymphocytes T et B (42). Cette hypothèse a été confirmée par plusieurs études faites *in vitro* ou *in vivo*, chez

l'Homme ou l'animal, montrant que les éosinophiles stimulent les lymphocytes, cette activation étant spécifique des antigènes (43,44).

### 4.3. Fonctions cytotoxiques

La cytotoxicité des éosinophiles est, après stimulation, en grande partie attribuable à leurs protéines cationiques, libérées en grande quantité et extrêmement rapidement puisqu'elles sont stockées dans les granules. Il est à noter que ces cellules exercent leur activité cytotoxique également via la libération d'autres médiateurs pré- et néo-formés.

#### 4.3.1 Les protéines cationiques

Protéine	Activité anti-infectieuse	Activité cytotoxique (lignées cellulaires)	Autres effets
<b>MBP</b>	<u>Parasites</u> : <i>S. mansoni</i> <i>T. cruzi</i> <i>T. spiralis</i> <u>Bactéries</u> : <i>S. aureus</i> <i>E. Coli</i>	Epithélium bronchique Epithélium nasal Carcinome du colon (T84) Leucémie myéloïde (HL60 – K562)	Agoniste plaquettaire Antagoniste des récepteurs muscariniques M2 Libération d'histamine Favorisation de la fibrose
<b>ECP</b>	<u>Parasites</u> : <i>S. mansoni</i> <i>T. spiralis</i> <i>B. pahangi</i> <i>B. malayi</i> <i>T. cruzi</i> <u>Bactéries</u> : <i>E. Coli</i> <i>S. aureus</i> <u>Virus</u> : RSV	Carcinome du poumon (H69) Leucémie myéloïde (HL60 – K562) Carcinome de la peau (A431) Carcinome du sein (MDA-MD-453) Adénocarcinome de l'utérus (HeLa) Carcinome du colon (Colo-205)	Neurotoxine Libération d'histamine Neutralisation de l'héparine
<b>EDN</b>	<u>Parasites</u> : <i>T. spiralis</i> <i>B. pahangi</i> <i>B. malayi</i> <u>Bactéries</u> : <i>E. coli</i> <u>Virus</u> : RSV, VHB, VIH Virus parainfluenza	Sarcome de Kaposi (KS Y-1) Carcinome du colon (Colon-205)	Neurotoxine Alarmine
<b>EPO</b>	<u>Parasites</u> : <i>S. mansoni</i> <i>T. cruzi</i> <i>B. malayi</i> <u>Bactéries</u> : <i>E. Coli</i> <i>M. tuberculosis</i> <u>Virus</u> : RSV ; rhinovirus	Carcinome du poumon (A549) Epithélium respiratoire	Libération d'histamine

**Tableau 1 : Rôle des protéines cationiques de l'éosinophile**

Table adaptée de Malik A, Batra JK. Antimicrobial activity of human eosinophil granule proteins: involvement in host defence against pathogens. Crit Rev Microbiol, 2012

### *a. Présentation*

La présence des protéines basiques dans les granules des éosinophiles est une caractéristique qui les distingue des autres granulocytes. Les protéines MBP, ECP, EDN et EPO jouent un rôle à la fois dans la défense de l'hôte mais également dans la pathogénèse de certaines maladies (Tableau 1).

- **La MBP** représente, à elle seule, 50% des protéines granulaires. Il en existe deux isoformes, la MBP-1 et la MBP-2. Bien que la MBP-2 semble avoir les mêmes propriétés fonctionnelles que la MBP-1, elle est beaucoup moins basique ( $pI = 8.7$  vs  $pI > 11$ ) et active que cette dernière. Cependant, elle est aussi plus spécifique puisque la MBP-1 a également été mise en évidence, en quantité moindre, dans les basophiles (45). L'activité cytotoxique de la MBP s'exerce par sa capacité à perturber l'équilibre électrostatique de la bicouche phospholipidique de la membrane des cellules cibles en augmentant sa perméabilité. Cette protéine possède donc une activité helminthotoxique, bactéricide et potentiellement tumoricide (26). Outre son activité cytotoxique, la MBP est capable d'activer les plaquettes, les neutrophiles, les basophiles et les éosinophiles eux-mêmes (46,47). Elle est aussi susceptible d'accroître la réactivité des muscles lisses bronchiques en agissant comme antagoniste de récepteurs muscariniques M2 (48). Enfin, en induisant la transcription de facteurs de croissance ou d'éléments de la matrice extracellulaire, la MBP joue également un rôle dans le remodelage et la fibrose (49).
- **L'ECP**, ou ARNase 3, possède une très forte activité ARNase et a donc la capacité d'hydrolyser l'ARN polymérique. En général, cette activité enzymatique est nécessaire à ses propriétés antivirales et neurotoxiques mais pas à ses activités antibactériennes ou antihelminthiques (50). Celles-ci sont dues à son effet déstabilisant sur les lipides membranaires. L'ECP n'est pas internalisée et son effet commence par une simple liaison à la membrane plasmique, puis à une agrégation conduisant à l'altération de son intégrité (51). L'activité cytotoxique de l'ECP est influencée par plusieurs paramètres : son génotype et son degré de glycosylation. En effet, plusieurs polymorphismes ont été identifiés sur le gène codant pour l'ECP (52,53), reliés à sa fonction ou à son contenu cellulaire. De plus, cette protéine est produite sous plusieurs formes glycosylées (54).
- **L'EDN**, ou ARNase 2, possède une activité ribonucléase cent fois supérieure à celle de l'ECP, lui conférant une activité neurotoxique, mais également, antivirale très importante. Par contre, son potentiel cytotoxique, *in vitro*, envers les bactéries et les helminthes est moindre comparé à l'ECP (26). L'EDN n'est pas uniquement produite par les

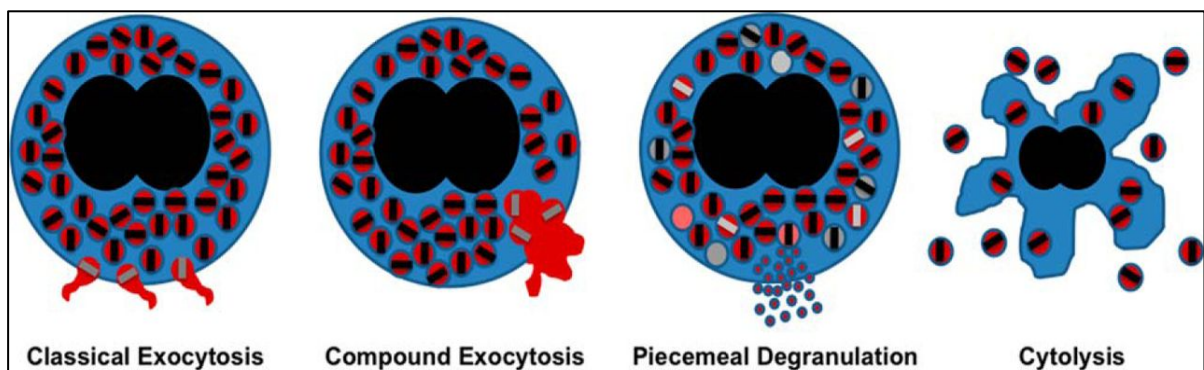


éosinophiles mais aussi par les macrophages activés par du TNF et du LPS (55). Actuellement, l'EDN est considérée, non plus comme une neurotoxine, mais comme une alarmine (56), au même titre que les défensines, les cathélicidines ou la HMGB1. Ces médiateurs, hautement immunostimulants, sont considérés comme des signaux de danger chargés d'alerter le système immunitaire en cas de dommages cellulaires et d'infections. En effet, l'EDN attire et active les cellules dendritiques via le TLR2 et augmente ainsi la réponse immune, principalement de type 2 (56).

- **L'EPO**, de la famille des haloperoxydases, est la protéine cationique la plus spécifique des éosinophiles. Elle conduit, en présence de peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$ , à la production d'halogénures et de bromures toxiques, lui permettant d'avoir des effets bactéricide, antihelminthique, antifongique et tumoricide (26). L'EPO permet également la maturation des autres protéines cationiques par nitration des résidus tyrosine présents dans leurs structures. Celle-ci est indépendante d'un contexte inflammatoire. Le potentiel cytotoxique des protéines cationiques serait donc dépendant d'une modification post-transcriptionnelle médiée par l'EPO (57).

#### *b. Mécanismes de dégranulation*

Trois mécanismes conduisant à la libération des protéines contenues dans les granules secondaires des éosinophiles ont été décrits (Fig. 6) (10,58).



**Figure 6 : Mécanismes de dégranulation des éosinophiles**

Les éosinophiles libèrent le contenu de leurs granules secondaires par trois mécanismes différents : l'exocytose, classique ou composée, la piecemeal dégranulation et la cytolyse.

Figure tirée de K.R. Acharya, S.J. Ackermann. Eosinophil granule proteins : form and function. J. Biol. Chem. 2014.

- **La « piecemeal degranulation »** est le mécanisme de dégranulation le plus fréquemment observé chez l'éosinophile (59). Elle permet la libération sélective de ses protéines par bourgeonnement de petites vésicules à partir des vésicules secondaires. En effet, les éosinophiles sont doués d'une plasticité fonctionnelle. Par exemple, la stimulation par des complexes IgG entraîne la libération sélective d'ECP et d'EDN, celle par des complexes IgE conduit au relargage d'EPO et d'EDN alors que les complexes IgA induisent la libération des trois protéines matricielles (60). Cette dégranulation ne change pas la morphologie des éosinophiles. Cependant, en microscopie électronique, on peut observer des granules secondaires à moitié vidés. Le transport des protéines vers la membrane peut être assuré par la formation de petites vésicules rondes classiques. En réponse à certaines cytokines, comme l'IFN $\gamma$ , les éosinophiles développent aussi des structures vésico-tubulaires, appelées vésicules sombrero 'EoSV', qui restent viables et qui permettent une réponse très rapide lors d'une stimulation ultérieure.
- **L'exocytose** est possible par fusion directe de la membrane des granules avec la membrane plasmique, libérant la totalité du contenu granulaire. Cette exocytose peut être simple, fusion d'un seul granule, ou composée, fusion préalable de plusieurs granules entre eux avant libération dans le milieu extracellulaire. Ce mécanisme de dégranulation conduit à la modification morphologique de ces éosinophiles activés, qui sont alors appelés « hypodenses » car extrêmement vacuolés et de densité moindre. La régulation de cette exocytose est possible grâce à la formation de complexes protéiques composés de v-SNARES (récepteur SNAP présent sur la vésicule de sécrétion), et de t-SNARES (protéines exprimées sur la membrane de l'organe cible). Ainsi, les éosinophiles expriment VAMP-2 et VAMP-7 sur la membrane de la vésicule sécrétoire, et SNAP-23 et la syntaxin-4, au niveau de la membrane plasmique (61).
- **La cytolyse** conduit à l'expulsion dans le milieu extracellulaire de l'ensemble des granules, appelés 'cell-free granules' puis de leur contenu. Cette libération peut être due à la lyse de l'éosinophile mais également à une cytolyse non apoptotique, dont les mécanismes ne sont pas encore connus.

Evidemment, la libération sélective des médiateurs selon les stimuli s'applique également aux autres médiateurs de l'éosinophile tels que les cytokines permettant l'orientation des réponses immunes vers un profil Th1, Th2 ou Th17 (10,62).

#### 4.3.2 Les espèces réactives de l'oxygène

Les éosinophiles peuvent répondre, après activation, par une libération précoce d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). Ceux-ci sont formés par la réduction de l'oxygène par la NADPH oxydase. L'ion superoxyde est ensuite transformé, en présence de superoxyde dismutase, en peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) qui, en présence de brome et sous l'action de l'EPO, peut être transformé en oxygène singulet. Ces ROS confèrent à l'éosinophile un rôle cytotoxique et pro-inflammatoire (31,63).

#### 4.3.3 Cytotoxicité dépendante des anticorps (ADCC)

Il a été démontré, dans notre laboratoire, que les éosinophiles étaient capables de tuer *in vitro* les larves de *Schistosoma mansoni* via un mécanisme ADCC dépendant d'anticorps IgE qui entraînent leur dégranulation et la libération de médiateurs cytotoxiques au contact des larves parasitaires (64,65). Les autres classes d'anticorps IgA et IgG participent également à l'ADCC ainsi que les molécules du complément (66,67). L'ADCC pourrait ainsi participer à l'immunité antiparasitaire et pourrait également être impliquée dans l'immunité anti-tumorale, les cellules cancéreuses exprimant des antigènes spécifiques reconnus par des anticorps (68).

### 4.4. Fonctions immunorégulatrices

#### 4.4.1 Récepteurs et sécrétion de cytokines

##### a. Récepteurs

L'éosinophile est susceptible de fixer de nombreuses cytokines. Ainsi, les récepteurs pour l'IL-2, -3, -4, -5, -9, -10, -12, -13, -17, -23, -25, -27, -31, -33 sont présents à leur surface. De même, ils expriment également les récepteurs du GM-CSF, du TNF, l'IFN $\gamma$  et du TGF $\beta$  (66) (Fig. 4).

##### b. Sécrétion

Si les éosinophiles sont capables de répondre à la stimulation par de nombreuses cytokines, ils sont capables d'en sécréter encore un plus grand nombre (66). Les éosinophiles ont une activité transcriptionnelle très faible comparée aux autres cellules du système immunitaire. La plupart des cytokines sont stockées dans leurs granules et/ou leurs vésicules,

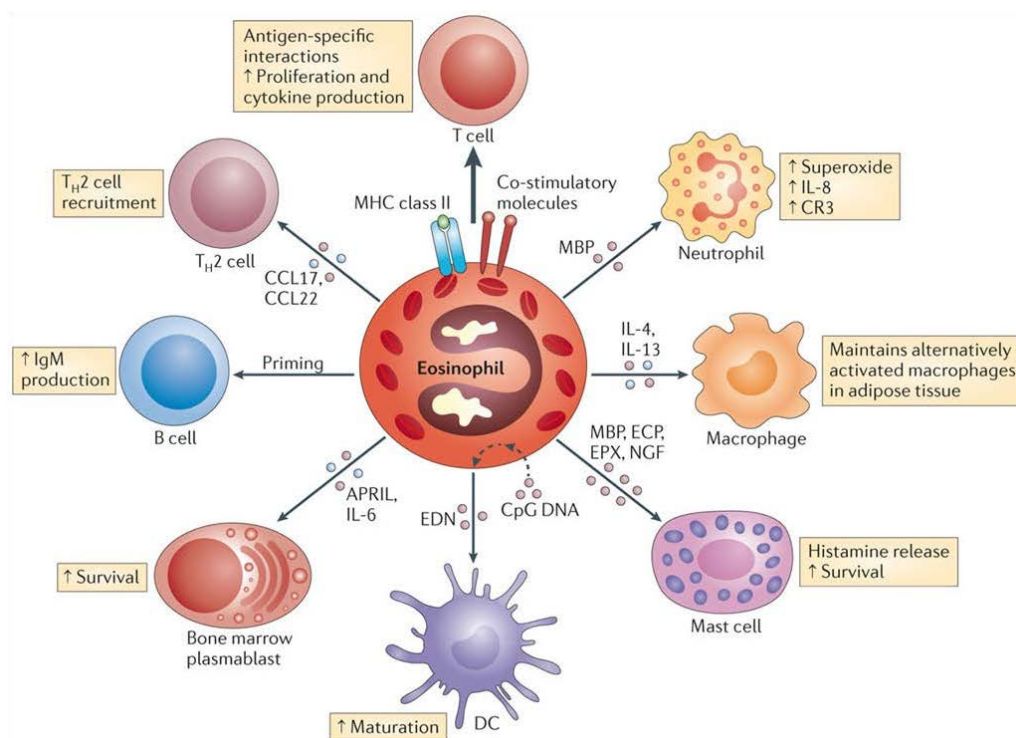
permettant leur libération rapide après activation. Par exemple, l'IL-13 se retrouve dans le core des granules (69) alors que l'IL-16 et le TNF sont localisés dans la matrice de ceux-ci (70).

#### 4.4.2 Polarisation de la réponse immune

Les éosinophiles sont capables de libérer sélectivement les cytokines de type Th1 (IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-12, IFN $\gamma$ ), Th2 (IL-4, IL-5), Th17 (IL-17, IL-23) ou immuno-régulatrices (IL-10) en fonction de l'environnement (62). En effet, une activation des éosinophiles par des IgE ou des IgA conduit à la libération de cytokines de type Th2, la stimulation par le CD28 amène quant à elle au relargage des cytokines de type Th1, IL-2 et IFN $\gamma$  (62). Cette capacité de libération spécifique leur confère la propriété de polariser la réponse immune vers un type ou un autre.

#### 4.4.3 Modulation de la fonction des leucocytes

Les éosinophiles sont capables d'exercer, via la production de leurs nombreux médiateurs, une activation des autres leucocytes (Fig. 7).



**Figure 7 : Modulation des fonctions des leucocytes par les éosinophiles**

Figure tirée de Rosenberg HF, Dyer KD, Foster PS. Eosinophils : changing perspectives in health and disease. Nat Rev Immunol. 2013.

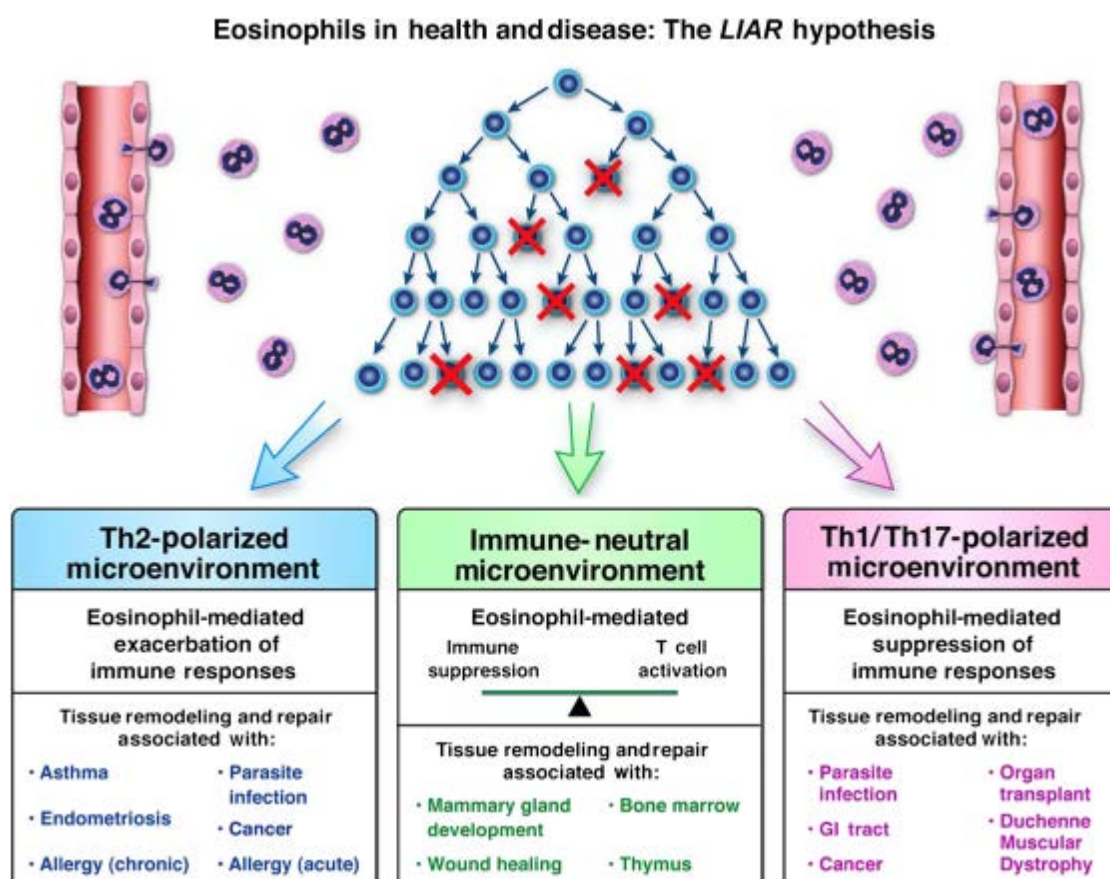
- **Lymphocytes T** : les éosinophiles sont des cellules présentatrices d'antigène qui peuvent exprimer des molécules du CMH de classe II et des molécules de co-stimulation. Cela leur permet de dialoguer avec les lymphocytes T et d'ainsi stimuler leur prolifération et leur production de cytokines selon le type d'antigène présenté (71). En réponse à un allergène, les éosinophiles, en agissant avec les cellules dendritiques, régulent le recrutement et la prolifération des lymphocytes Th2 par la libération des chimiokines CCL17 et CCL22 (72).
- **Lymphocytes B** : les éosinophiles stimulent les lymphocytes B pour la production d'IgM. Ils permettent également d'augmenter la survie des plasmocytes (71,73).
- **Cellules dendritiques** : ils induisent à la fois la maturation et l'activation de ces cellules, notamment via l'EDN (56).
- **Neutrophiles** : ces cellules sont activées par la MBP qui entraîne la libération d'IL-8 et de ROS (74). Les éosinophiles sont également capables de synthétiser et libérer la protectin D1 (PD1), médiateur lipidique anti-inflammatoire. Cette molécule est notamment reconnue pour diminuer l'influx en neutrophiles ainsi que leur production de cytokines pro-inflammatoires (75).
- **Macrophages** : les éosinophiles maintiennent les macrophages alternativement activés dans le tissu adipeux par la production d'IL-4 et d'IL-13 (23).
- **Mastocytes** : l'ECP, la MBP et l'EPO conduisent à la libération d'histamine par les mastocytes. La prolongation de leur survie est due au NGF (Nerve Growth Factor) produit par les éosinophiles (74).

#### 4.5. Fonctions de réparation et de remodelage tissulaire

Une récente hypothèse défend le fait que l'accumulation des éosinophiles au niveau des tissus participerait plus à une stratégie visant à maintenir l'homéostasie tissulaire plutôt qu'à une dérégulation immunitaire. Ce concept est appelé « LIAR hypothesis » pour 'Local Immunity And/or Remodeling/Repair' (Fig. 8) (20). Les éosinophiles sont capables d'interagir avec les cellules épithéliales, endothéliales ou fibroblastes par la libération de leurs cytokines mais également de facteurs de croissance (SCF, NGF, VEGF, PDGF, TGF- $\alpha$  et - $\beta$ ) (66).

Le recrutement des éosinophiles périphériques a lieu en réponse à la libération d'un ou plusieurs médiateurs de l'inflammation (comme les DAMPs) par des cellules mortes

localement. Avec un contexte favorable, comme la présence d'IL-5 et de GM-CSF provenant de l'épithélium, les éosinophiles peuvent s'accumuler à l'état non activé. Le microenvironnement immunitaire tissulaire dirige ensuite les fonctions des éosinophiles conduisant soit à l'exacerbation de la réponse immune locale, soit à sa suppression ou bien encore, cas le plus fréquent, à ne pas ou peu la modifier. Dans tous les cas, en retour, les éosinophiles modulent le remodelage ou la réparation tissulaire (Fig. 8). Il est important de noter que cette fonction des éosinophiles est liée à une situation physiologique, dans le tractus digestif par exemple, mais également en conditions pathologiques, dans l'asthme, les infections parasitaires ou encore les situations tumorales (20).



**Figure 8 : Représentation schématique de la « LIAR hypothesis » et de ses conséquences en homéostasie ou pathologie.**

: éosinophiles; : mort cellulaire; : prolifération cellulaire ou activation des cellules souches.

Figure tirée de Lee J.J., Jacobsen E.A., McGarry M.P., Schleimer R.P., Lee N.A. Eosinophils in health and disease: the LIAR hypothesis. Clin. Exp. All. 2010.

## 5. Rôle des éosinophiles en pathologie

<i>Pathologies</i>	<i>Effets des éosinophiles</i>
<b>Cancer</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Indicateurs de risque</li> <li>- Recrutement et polarisation des lymphocytes T</li> <li>- Cytotoxicité</li> <li>- Remodelage tissulaire</li> </ul>
<b>Maladies démyélinisantes</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Sclérose en plaque</li> <li>- Névrite optique</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Polarisation des lymphocytes T</li> <li>- Survie des nerfs</li> <li>- Survie des plasmocytes</li> </ul>
<b>Rejet de greffe</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Indicateurs de risque</li> <li>- Recrutement et polarisation des lymphocytes T</li> <li>- Cytotoxicité</li> <li>- Remodelage tissulaire</li> </ul>
<b>Maladies métaboliques</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Diabète de type 2</li> <li>- Athérosclérose</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Dépôt de graisse</li> <li>- Recrutement et polarisation des macrophages M2</li> <li>- Fibrose et remodelage tissulaire</li> <li>- Prolifération des muscles lisses</li> <li>- Remodelage vasculaire</li> </ul>
<b>Maladies inflammatoires de l'intestin</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Maladie de Crohn</li> <li>- Rectocolite hémorragique</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Recrutement et polarisation des lymphocytes T</li> <li>- Fibrose et remodelage tissulaire</li> <li>- Hyperplasie des muscles lisses</li> <li>- Hyperplasie et dommage des cellules épithéliales</li> <li>- Remodelage vasculaire</li> </ul>
<b>Maladies pulmonaires</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Asthme</li> <li>- Hypertension pulmonaire</li> <li>- Fibrose pulmonaire</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Recrutement et polarisation des lymphocytes T</li> <li>- Fibrose et remodelage tissulaire</li> <li>- Hyperplasie des muscles lisses</li> <li>- Hyperplasie et dommage des cellules épithéliales</li> <li>- Remodelage vasculaire</li> </ul>
<b>Allergie / Dermatite de contact</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Croissance et survie neuronale</li> <li>- Fibrose</li> <li>- Modulation de la réponse immune</li> </ul>

**Tableau 2 : Rôle des éosinophiles en pathologie**

Table adaptée de Jacobsen EA, Helmers RA, Lee JJ, Lee NA. The expanding role(s) of eosinophils in health and disease. Blood, 2012

Une hyperéosinophilie (HE) se définit comme une augmentation du taux d'éosinophiles circulants supérieur à  $0.5 \times 10^9/L$  et peut avoir plusieurs origines. En raison de leur fréquence, les causes allergiques, médicamenteuses ou parasitaires sont tout d'abord évoquées. Nous avons vu précédemment que les éosinophiles sont des cellules multifonctionnelles, à l'interface entre l'immunité innée et adaptative par l'expression de médiateurs et récepteurs très variés, ils jouent donc un rôle majeur dans le développement ou le contrôle de nombreuses pathologies (Tableau 2) (74,76). Les modèles murins, avec une modification du nombre d'éosinophiles, permettent notamment l'étude de leur rôle physiopathologique

(Tableau 3). Cependant, l'action exacte de ces cellules n'est pas encore élucidée, et semble notamment dépendre des stades des pathologies. Les paragraphes suivants ne constituent donc pas une liste exhaustive de toutes les pathologies dans lesquelles les éosinophiles sont impliqués mais plutôt des exemples pour lesquels les rôles des éosinophiles sont soit délétères, soit bénéfiques, soit à déterminer.

### 5.1. Asthme

Les éosinophiles exercent un rôle délétère en causant de nombreux dommages tissulaires dans des pathologies comme l'asthme et l'allergie. L'asthme est une maladie inflammatoire chronique des poumons qui se caractérise par une hyperréactivité bronchique, une éosinophilie associée à une réponse de type Th2 et une synthèse d'IgE. L'accumulation des éosinophiles au niveau des poumons est une conséquence importante de l'asthme. La libération, par ces cellules, de médiateurs lipidiques (leucotriènes, prostaglandines, thromboxane), de MBP et de ROS entraîne une bronchoconstriction, une hypersécrétion de mucus et une lyse des cellules mucosales (77). Ainsi, les éosinophiles et les molécules qui régulent leur développement et leur recrutement semblent être des cibles de choix dans le traitement de l'asthme. Dans ce contexte, des essais cliniques ont été réalisés sur l'utilisation de deux anticorps monoclonaux anti-IL-5, le mépilizumab et le reslizumab. Bien que ces deux anticorps thérapeutiques réduisent le nombre des éosinophiles sanguins et pulmonaires, aucun bénéfice clinique n'a pu être objectivé (78,79). L'asthme est une pathologie très hétérogène, et, à la suite de ces résultats, la notion de sous-type selon le phénotype inflammatoire a été introduit (asthme neutrophilique, éosinophilique, mixte). Ainsi, il a récemment été démontré une amélioration du contrôle de l'asthme par les anti-IL-5 chez les sujets souffrant d'un asthme éosinophilique résistant aux corticoïdes (80,81).

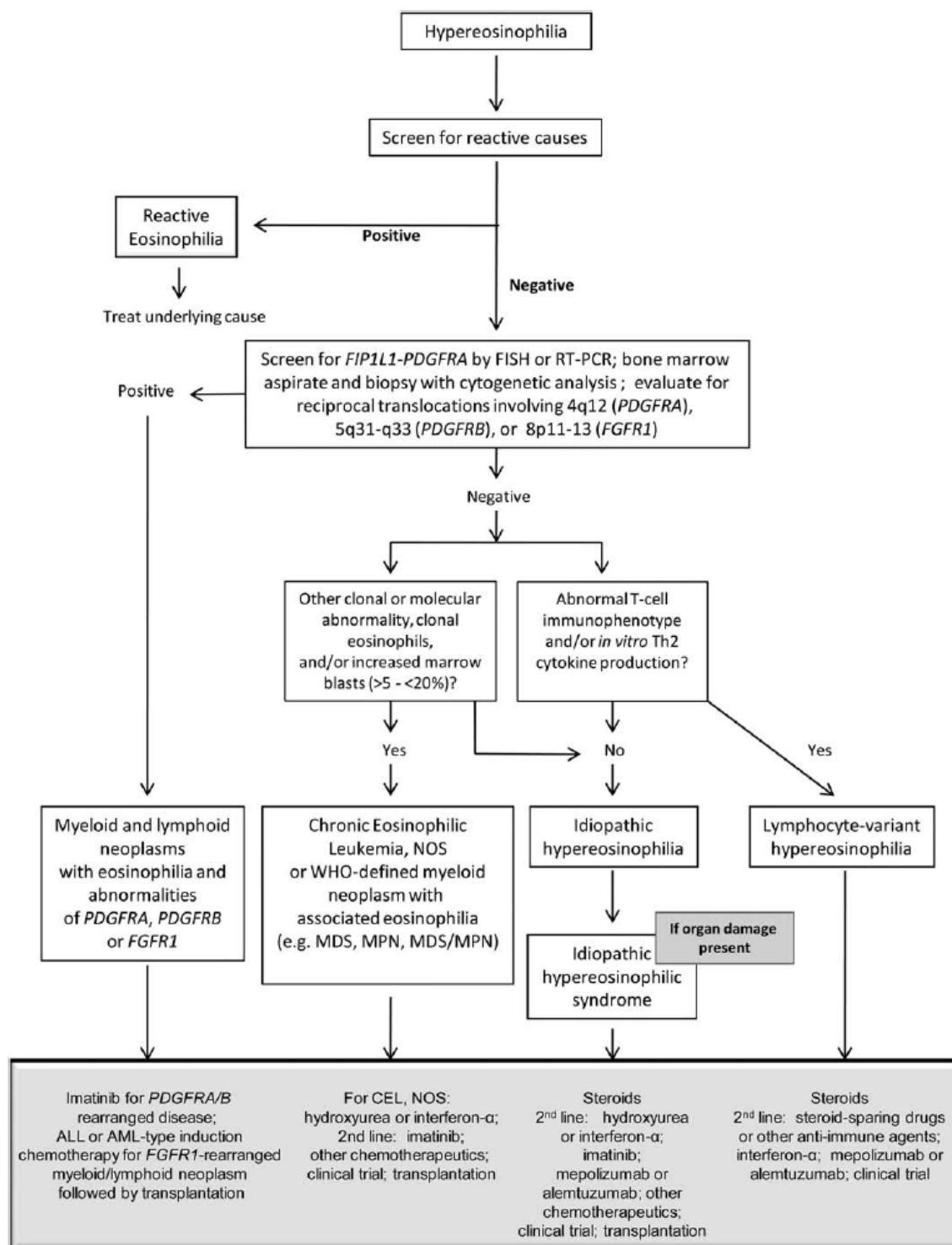
### 5.2. Syndromes Hyper-Eosinophiles

Devant toute HE massive ( $> 1,5 \times 10^9/L$ ) chronique, supérieure à 6 mois, et inexpliquée en dépit d'une enquête étiologique bien menée, on se doit d'évoquer le Syndrome Hyper-Eosinophilique ou SHE. Ces SHE sont cliniquement extrêmement hétérogènes. Bien qu'ils puissent être asymptomatiques, les principales manifestations cliniques sont pulmonaires, cutanées, digestives, neurologiques et cardiaques. Leur classification est en perpétuelle



renouvellement, la dernière datant de 2014 (82). On peut cependant les classer schématiquement en trois, voire quatre, situations distinctes (Fig. 9):

- **Le SHE myéloprolifératif (SHE-M).** Au niveau physiopathologique, une délétion à l'origine du gène de fusion FIP1L1-PDGFRA (F/P) est identifiée chez certains patients atteints de SHE-M (83). Ce gène code pour une protéine tyrosine kinase ayant une activité constitutive. Dans une étude, menée en collaboration avec notre laboratoire, il a été démontré que, chez ces patients, le traitement par un inhibiteur de protéine kinase, l'imatinib mesylate (Glyvec®), conduit à une rémission clinique, hématologique et même moléculaire pour certains (84). Ce traitement est également efficace sur des patients ne présentant pas ce gène, suggérant l'existence d'autres anomalies moléculaires sur des tyrosines kinases.
- **Le SHE lymphoïde (SHE-L)** est dû à une prolifération clonale de lymphocytes à phénotype aberrant (majoritairement le phénotype CD3<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup>), producteur d'IL-5, d'IL-4 et d'IL-13. L'origine de ces dérèglements n'est pas connue et le traitement consiste en une corticothérapie ou à l'administration de mépolizumab (82,85,86).
- **Le SHE idiopathique :** certains SHE ne s'intègrent ni dans le variant myéloïde, ni dans le variant lymphoïde. Par définition, les mécanismes de pathogenèse des SHE idiopathiques restent inconnus. Comme pour les autres formes, il est caractérisé par une infiltration en éosinophiles avec libération de protéines cationiques et de médiateurs inflammatoires. Le traitement de première ligne, s'il est symptomatique, est l'administration de corticoïdes. D'autres agents immuno-modulateurs et cytotoxiques peuvent également être utilisés, tels que l'hydroxyurée, la vincristine ou l'alemtuzumab (anti-CD52).  
Dans toutes ces pathologies, la transplantation de moelle osseuse peut également être envisagée.
- **Le SHE familial** est une pathologie autosomique dominante. L'hyperéosinophilie est présente dès la naissance et reste stable au cours du temps et est, en général, peu symptomatique. L'anomalie génétique n'est actuellement pas encore connue.



**Figure 9 : Tableau décisionnel au diagnostic et traitement des éosinophilies**

Figure tirée de Gotlib J. World Health organization-defined eosinophilic disorders: 2014 update on diagnosis, risk stratification and management. Am J Hematol. 2014

### 5.3. Maladies Inflammatoires Chronique de l'Intestin (MICI)

Les MICI comprennent la maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique (RCH). Ces pathologies, entraînant diarrhée, constipation et perte de poids, sont notamment caractérisées par une inflammation et un remodelage tissulaire important dans l'ensemble du tube digestif pour la maladie de Crohn et au niveau du côlon et rectum pour la RCH. Bien que les éosinophiles soient présents dans le tube digestif en condition homéostatique, une accumulation importante de ces cellules est observée chez les patients atteints de MICI (87). Cependant, le rôle des éosinophiles dans ces pathologies reste mal connu. Par exemple, des études cliniques ont montré un nombre augmenté d'éosinophiles au niveau du côlon de patients atteints de RCH lors des poussées de la maladie et une diminution suivant le traitement, suggérant un rôle pathogénique des éosinophiles (88). A l'inverse, une autre étude retrouve une augmentation des éosinophiles pendant les phases silencieuses de la RCH (89). De même, les modèles murins de MICI apportent des résultats contradictoires. En effet, certaines études montrent une colite, induite au DSS, moins importante dans des modèles murins déficients en éosinophiles (PHIL et  $\Delta$ dblGATA) (90,91). Dans le même modèle (souris PHIL) et un modèle utilisant un anticorps anti-IL-5, Masterson JC *et al.* ont démontré, au contraire, que l'absence d'éosinophile conduit à une inflammation et une mortalité plus importante après traitement au DSS. Les éosinophiles diminuent la réponse inflammatoire, notamment par la libération de PD-1 (92). Ces résultats contradictoires pourraient notamment s'expliquer par les différences expérimentales, notamment au niveau du statut sanitaire des animaleries. Les réponses pro/anti-inflammatoires des éosinophiles pourraient être modulées selon le microbiote ou l'exposition à des endotoxines (93). Comprendre les mécanismes impliqués dans la physiopathologie ou la protection des éosinophiles dans ces maladies inflammatoires pourrait permettre l'utilisation de molécules immuno-modulatrices en thérapeutique. Dans notre laboratoire, un traitement immunothérapeutique par une protéine parasitaire, la P28GST, conduit à une diminution de la colite expérimentale, induite par du TNBS, en impliquant notamment une infiltration massive d'éosinophiles (M. Capron, manuscrit en préparation).

### 5.4. Tumeurs

La participation des éosinophiles à l'immunité anti-tumorale sera plus particulièrement décrite dans le paragraphe III de la partie introductive de cette thèse (p.38) de cette thèse. En

effet, il est à noter que plusieurs études épidémiologiques ont mis en évidence une corrélation inverse entre les antécédents d'allergie et l'apparition de nombreux types de cancer. Les éosinophiles sont présents dans l'infiltrat de nombreux types de tumeurs et cette infiltration est, en général, associée avec une valeur pronostique positive. De plus, la découverte récente de récepteurs et médiateurs chez les éosinophiles humains, partagés avec les lymphocytes T et connus pour être impliqués dans l'immunité anti-tumorale, suggèrent que les éosinophiles pourraient jouer un rôle dans la défense anti-tumorale. Cette hypothèse a également été soutenue, dans des modèles expérimentaux et chez l'Homme (94).

	Souche murine	Caractéristiques	Références
<b>Modèles avec éosinophilie</b>	Tg IL-5	Sur-expression en IL-5. Augmentation du nombre basal d'éosinophiles	(95)
	Double Tg IL-5 / CCL24	Sur-expression de l'IL-5 et de la CCL24. Eosinophilie pulmonaire et dégranulation <i>in situ</i>	(96)
<b>Modèles déficients en éosinophiles</b>	$\Delta$ dblGATA	Modification de la séquence palindromique double GATA du gène GATA-1	(97)
	<i>Mbp-1<sup>-/-</sup>Epx<sup>-/-</sup></i>	Délétion des gènes de la MBP-1 et de l'EPO	(98)
	Tg PHIL	Expression de la toxine A diphtérique sous le contrôle de l'EPO	(99)
<b>Diminution du nombre ou du recrutement tissulaire des éosinophiles</b>	<i>Il-5<sup>-/-</sup></i>	Délétion du gène de l'IL-5. Taux basal d'éosinophiles mais pas d'éosinophilie après stimulation Th2	(8)
	<i>Ccl11<sup>-/-</sup></i>	Délétion du gène de la CCL11. Diminution du recrutement pulmonaire et intestinal des éosinophiles	(100)
	<i>Ccl24<sup>-/-</sup></i>	Délétion du gène de la CCL24. Diminution du recrutement pulmonaire des éosinophiles	(101)
	<i>Ccr3<sup>-/-</sup></i>	Délétion du gène du récepteur aux éotaxines. Diminution du recrutement tissulaire	(102)

Tableau 3 : Principaux modèles murins génétiquement modifiés utilisés pour l'étude des éosinophiles

## II. L'interleukine-18

L'IL-18 fut décrite pour la première fois en 1989 comme un « IFN $\gamma$ -inducing factor » (IGIF), isolé à partir de sérum de souris infectées par *Mycobacterium bovis*, après injection intra-péritonéale d'endotoxine afin d'induire un choc septique (103). Ce facteur, capable de stimuler les lymphocytes et les cellules NK, pour favoriser une réponse de type Th1, fût ensuite purifié à partir de foie de souris et cloné par Okamura *et al* (104). Cette cytokine fait à présent partie de la famille de l'IL-1, comprenant 11 membres, aux structures, récepteurs et fonctions différentes (tableau 4).

Cytokine	Nom alternatif	Récepteur	Co-récepteur	Fonction
<b>IL-1<math>\alpha</math></b>	IL-1F1	IL-1R1 / IL-1R2	IL-1RAcP	Inflammation
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	IL-1F2	IL-1R1 / IL-1R2	IL-1RAcP	Inflammation
<b>IL-1Ra</b>	IL-1F3	IL-1R1		Inhibition de l'inflammation
<b>IL-18</b>	IL-1F4	IL-18R $\alpha$	IL-18R $\beta$	Inflammation
<b>IL-33</b>	IL-1F11	ST2	IL-1RAcP	Inflammation
<b>IL-36<math>\alpha</math></b>	IL-1F6	IL-36R	IL-1RAcP	Inflammation
<b>IL-36<math>\beta</math></b>	IL-1F8	IL-36R	IL-1RAcP	Inflammation
<b>IL-36<math>\gamma</math></b>	IL-1F9	IL-36R	IL-1RAcP	Inflammation
<b>IL-36Ra</b>	IL-1F5	IL-36R		Inhibition de l'inflammation
<b>IL-37</b>	IL-1F7	IL-18R $\alpha$		Inhibition de l'inflammation
<b>IL-38</b>	IL-1F10	IL-36R		Inhibition de l'inflammation

**Tableau 4 : Nomenclature et principales fonctions de membres de la famille de l'IL-1**

Tableau adapté de Garlanda C, Dinarello CA, Mantovani A. The interleukin-1 family : back to the future. Immunity, 2013

Bien que l'IL-18 ressemble à l'IL-1 $\beta$  dans le fait qu'elle soit synthétisée sous forme d'un précurseur inactif, sa structure tertiaire est très proche de celle de l'IL-37. De même, à la différence de l'IL-1 $\beta$ , le précurseur de l'IL-18 est présent dans les monocytes de donneurs sains et au niveau des cellules épithéliales de tout le tractus gastro-intestinal (105). Par cet aspect, l'IL-18 est plus semblable aux alarmines IL-1 $\alpha$  et IL-33.

## **1. Production de l'IL-18**

### **1.1. Cellules productrices d'IL-18**

L'IL-18 est produite, chez l'homme et la souris, par de nombreux organes et types cellulaires qu'ils soient hématologiques ou non (106). Parmi eux, on peut citer les cellules de küppfer (104), les monocytes (107), les cellules dendritiques (108), les macrophages, les kératinocytes (109), les chondrocytes, les fibroblastes, les ostéoblastes (110) et les cellules épithéliales intestinales (111). Il est à noter que la production de cette cytokine par les éosinophiles, humains ou murins, n'a pas encore été démontrée.

### **1.2. Clivage de l'IL-18**

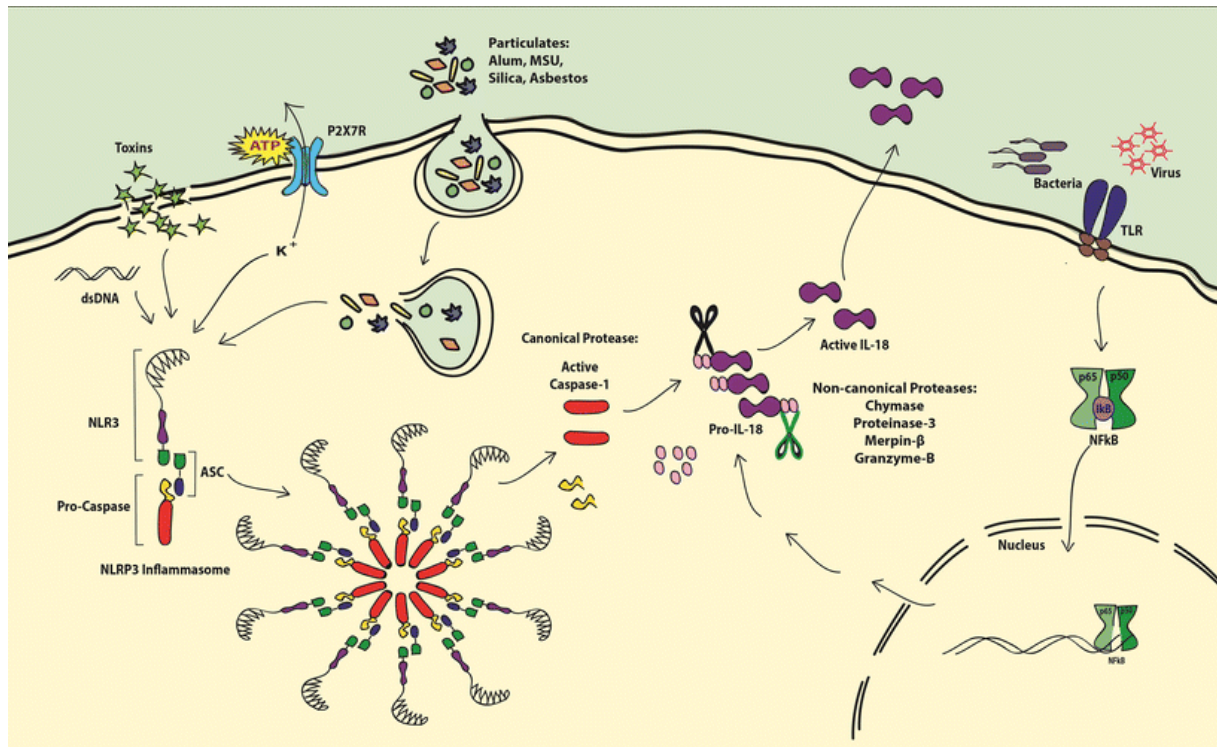
La production d'IL-18 mature est un processus complexe, faisant intervenir plusieurs acteurs. La diversité des enzymes impliquées dans ce clivage, dans de nombreux types cellulaires, montre l'importance de cette cytokine dans les réponses inflammatoires.

Comme l'IL-1 $\beta$ , l'IL-18 est tout d'abord produite sous la forme d'un précurseur inactif, la pro-IL-18, de poids moléculaire de 24 000 Daltons. Après clivage, en général par la caspase-1, l'IL-18 est sécrétée sous forme active de 18 000 Daltons (112). Cependant, une sécrétion d'IL-18 est également observée chez des souris déficientes en caspase-1, suggérant l'existence d'autres voies de clivage (113) (Fig. 10).

#### **1.2.1 Caspase-1 et inflammasome**

La pro-IL-18 est localisée au niveau cytoplasmique. Celle-ci doit être clivée pour devenir active et pour être libérée dans le compartiment extracellulaire. Ce clivage se fait majoritairement par la caspase-1, ou ICE (Interleukin-1 $\beta$ -Converting Enzyme), initialement identifiée comme l'enzyme clivant l'IL-1 $\beta$  (114). Cette caspase-1 est produite sous forme d'une pro-enzyme inactive, le zymogène. La conversion en forme active nécessite un auto-clivage (115). Après stimulation, par des DAMPs ou des PAMPs (116), la pro-caspase-1 et un senseur cytosolique, l'ASC (Caspase-1 adaptor protein) forment un complexe multiprotéique. Ce complexe interagit avec un NLR (NOD-Like Receptor) ou un ALR (AIM2-Like Receptor) pour générer un heptamère, de conformation stable, appelé inflammasome (117). Dans cet inflammasome, les pro-caspase-1 sont suffisamment proches les unes des autres pour qu'elles

se lysent mutuellement et ainsi de devenir actives. La pro-IL-18 peut donc également être clivée sous forme active (Fig. 10). Actuellement, l'inflammasome le plus étudié est le NLRP3 (ou NALP3) inflammasome, mais d'autres inflammasomes formés par le NLRP1, NLRP6, NLRP7, NLRP12, NLRC4, AIM2 ou IFI sont également capables de cliver l'IL-1 $\beta$  et l'IL-18 (118).



**Figure 10 : Structure de l'inflammasome et production de l'IL-18 active**

L'inflammasome est un complexe multi-protéique formé après stimulation par des PAMPs ou DAMPs. Il s'ensuit la libération de la caspase-1 sous forme active qui peut ainsi cliver la pro-IL-18 en IL-18 active qui sera ensuite sécrétée dans le compartiment extracellulaire

Figure tirée de Sedimbi SK, Hägglöf T, Karlsson MCI. IL-18 in inflammatory and autoimmune disease. Cell. Mol. Life Sci. 2013.

### 1.2.2 Autres caspases

Chez des souris déficientes en caspase-1, une sécrétion d'IL-18 a été observée (113). Cependant, l'utilisation d'inhibiteurs des caspases inhibent cette production, démontrant que des caspases, autres que la caspase-1 sont capables de cliver la pro-IL-18 (113). La signalisation induite par Fas (CD95) active la caspase-8 dans les macrophages et les cellules dendritiques. Cette activation conduit à la maturation et à la libération de l'IL-18 (119). La caspase-3, quant à elle, est capable de cliver à la fois le précurseur et la forme mature de l'IL-18 pour générer deux formes biologiquement inactives (120).

### 1.2.3 Clivage indépendant des caspases

La détection de la pro-IL-18 dans des cellules non hématologiques, qui n'expriment pas de caspase, telles que les kératinocytes, indique qu'il existe également un mécanisme de production de l'IL-18 indépendant des caspases (Fig. 10). Il a notamment été démontré que le granzyme B est capable de cliver la pro-IL-18 et que ce clivage se fait dans des cellules déficientes en caspase-1 (121). Une autre molécule impliquée également dans la maturation de l'IL-18 est la PR3 (Proteinase-3), exprimée principalement par les neutrophiles mais également par les monocytes, les macrophages et les basophiles. Ce processus a également lieu dans les cellules épithéliales orales humaines en présence d'un inhibiteur spécifique de la caspase-1 ou d'un inhibiteur général des caspases (122). Une autre protéinase, la chymase, spécifiques des mastocytes, peut également cliver la pro-IL-18 (123). Enfin, la merpin- $\beta$ , une metalloprotéase présente dans les cellules épithéliales digestives et rénales, est également capable de produire une IL-18 biologiquement active (124).

### 1.2.4 Clivage extracellulaire

Bien que le clivage intracellulaire soit la voie prépondérante pour la production d'IL-18 mature, il a également été démontré que les PBMCs humains sont également capables de sécréter de la pro-IL-18 (105), suggérant un clivage extracellulaire. De même, le précurseur inactif de cette cytokine reste dans le compartiment intracellulaire des cellules mésenchymateuses. Comme l'IL-1 $\alpha$  ou l'IL-33, ce précurseur est libéré lors de la lyse de ces cellules et clivé dans le compartiment extracellulaire. Les enzymes impliquées dans ce clivage ne sont pas encore réellement connues mais on peut tout de même invoquer la PR3 puisque cette protéinase, capable de cliver la pro-IL-18, peut être sécrétée et exercer son action enzymatique au niveau de la membrane plasmique des neutrophiles (122,125).

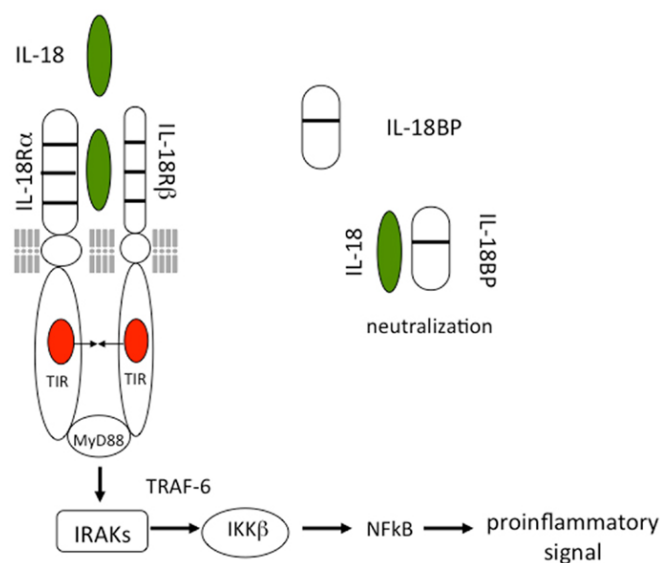
## **2. Signalisation et régulation de l'IL-18**

### 2.1. Le récepteur de l'IL-18

Le récepteur de l'IL-18 (IL-18R) est un complexe formé d'une chaîne de liaison à l'IL-18 mature, IL-18R $\alpha$  et d'un co-récepteur, l'IL-18R $\beta$  (126). Ce complexe est similaire à ceux formé par les autres cytokines de la famille de l'IL-1, avec le co-récepteur IL-1RAcP. A la suite de la formation de cet hétérodimère, les domaines TIR (Toll-IL-1 Receptor) se



rapprochent et il s'ensuit le recrutement séquentiel de MyD88, de protéines kinase IRAK-4, IRAK-1 et de l'adaptateur TRAF-6. La phosphorylation de I $\kappa$ B permet la libération de NF $\kappa$ B, qui migre jusqu'au noyau et initie la transcription des gènes cibles, comme celui de l'IFN $\gamma$  (Fig. 11) (127). Cependant, il existe des différences entre la signalisation de l'IL-1 et celle de l'IL-18. Alors que l'IL-1 $\alpha$  et l'IL-1 $\beta$  sont actives à des taux de l'ordre du pg/ml, l'activation des cellules par l'IL-18 nécessite un taux de 10-20 ng/ml, voire plus (128).



**Figure 11 : Signalisation de l'IL-18**

L'IL-18 forme un complexe en se liant à l'IL-18R $\alpha$ . Le co-récepteur IL-18R $\beta$  est nécessaire pour la formation d'un complexe de haute affinité. Les domaines TIR permettent le recrutement de MyD88, des IRAKs et de TRAF-6, entraînant l'activation de NF $\kappa$ B. L'IL-18BP est présente dans le compartiment extracellulaire où elle se lie à l'IL-18 mature, empêchant la liaison à son récepteur.

Figure tirée de Dinarello CA, Novick D, Kim S, Kaplanski G. IL-18 and IL-18 binding protein. *Frontiers in immunology*. 2013.

En plus de la voie du NF $\kappa$ B, d'autres facteurs sont également impliqués dans la signalisation de l'IL-18. Une activation par l'IL-18 conduit aussi à la phosphorylation de STAT3 et des MAP kinases. Une autre voie implique les Jak kinases qui phosphorylent les STATs et induisent l'expression génique. Par exemple, les souris déficientes en tyk2, faisant partie des Jaks, ont une diminution de la cytotoxicité des cellules NK et de la production d'IFN $\gamma$  (129).

## 2.2. L'IL-18 Binding Protein (IL-18BP)

### 2.2.1 Structure

L'IL-18 est une cytokine inflammatoire qui nécessite donc d'être régulée afin d'éviter des dommages liés à une inflammation trop importante. Cette régulation se fait notamment par la production d'un antagoniste endogène extracellulaire, l'IL-18 binding protein (IL-18BP). L'affinité de l'IL-18 pour l'IL-18BP est plus importante que celle pour son récepteur, cela empêche donc la liaison de l'IL-18 à l'IL-18R (Fig. 11). Chez l'homme, il existe quatre isoformes résultant de l'épissage alternatif du gène de l'IL-18BP, de l'IL-18BP<sub>a</sub> à l'IL-18BP<sub>d</sub>. L'IL-18BP varie de la définition classique des récepteurs solubles puisqu'elle ne correspond pas au domaine extracellulaire de l'IL-18 $\alpha$ . La capacité de ces isoformes à lier et neutraliser l'IL-18 est dépendante de la présence d'un domaine Ig. En effet, l'IL-18BP<sub>a</sub> a la plus forte affinité pour l'IL-18, suivi de l'IL-18BP<sub>c</sub>. Au contraire, l'IL-18BP<sub>b</sub> et <sub>d</sub>, qui n'ont pas de domaine Ig, sont incapables de lier et de réguler l'IL-18 (130).

### 2.2.2 Fonction

La fonction bénéfique ou délétère d'une augmentation de l'IL-18 dépend du contexte clinique dans laquelle elle est observée. Par exemple, l'expression d'IL-18BP par des virus, comme les poxvirus, inhibe l'IL-18 et donc la production d'IFN $\gamma$  et la cytotoxicité de cellules NK, permettant ainsi la propagation virale (131,132). D'un autre côté, l'IL-18BP peut aussi être impliquée dans la protection contre certaines pathologies dans lesquelles l'IL-18 est impliquée, telles que la polyarthrite rhumatoïde (133) ou l'hypersensibilité de contact (134).

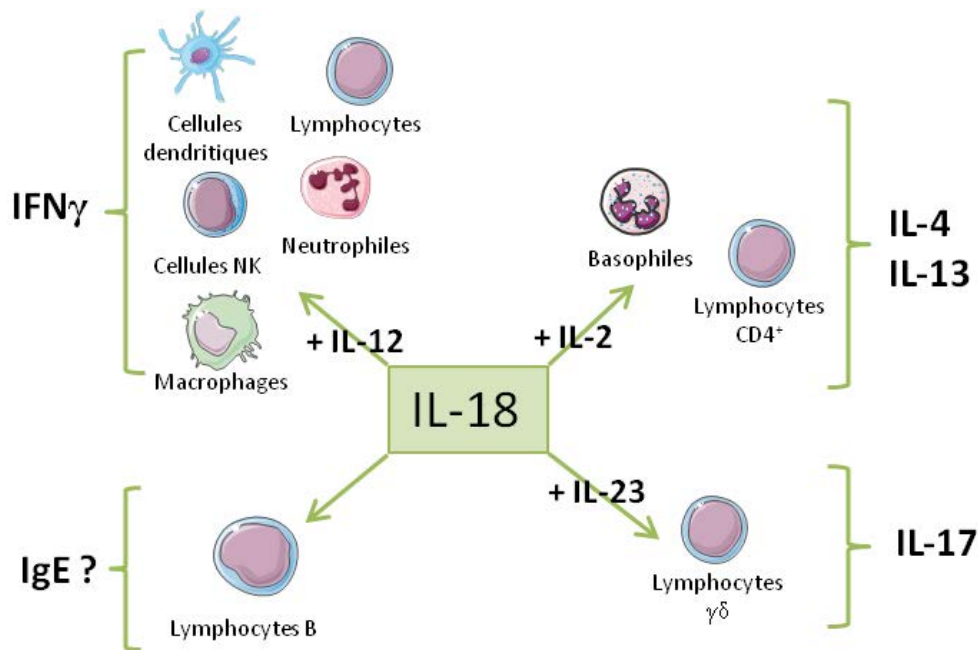
L'IL-18BP ne lie qu'une molécule d'IL-18. La détermination simultanée de ces deux protéines permet donc de connaître la concentration en IL-18 libre et active. Cette mesure pourrait être un indicateur important sur le devenir de la réponse immune, comme chez les patients en sepsis (135,136).

## 3. **Fonctions biologique de l'IL-18**

### 3.1. L'IL-18 : une cytokine immuno-régulatrice

Historiquement, l'IL-18 était considérée seulement comme un facteur induisant la libération d'IFN $\gamma$  par les cellules Th1 et NK (104). Cependant, l'IL-18 est aujourd'hui

reconnue comme une cytokine immuno-régulatrice par sa capacité à induire également des cytokines Th2 ou Th17 par les lymphocytes, les cellules NK, les basophiles ou encore les mastocytes (106,136). Cette capacité d'immuno-régulation semble être dépendante du contexte cytokinique (137) (Fig. 12).



**Figure 12 : Immuno-modulation de l'IL-18**

L'IL-18 induit la libération d'IFN $\gamma$ , d'IL-4, d'IL-13, d'IL-17 et potentiellement d'IgE en fonction du contexte cytokinique.

### 3.1.1 Induction de la production d'IFN $\gamma$

L'IL-18 n'induit, par elle-même, qu'une faible quantité d'IFN $\gamma$  chez les lymphocytes Th1. C'est également le cas de l'IL-12. Cependant, une stimulation combinée de ces deux cytokines induit la production d'IFN $\gamma$  de façon synergique (104,107,138). Il est à noter que cette production par les lymphocytes se fait indépendamment de l'engagement du TCR, comme c'est habituellement le cas (139,140).

L'action de l'IL-18 pour l'induction de la production d'IFN $\gamma$ , en présence d'IL-12 ou d'IL-15, se fait chez un grand nombre de type cellulaire : les lymphocytes CD4<sup>+</sup> (141), les lymphocytes CD8<sup>+</sup> (139), les lymphocytes T NK (NKT) (142), les cellules NK (106), les cellules dendritiques (143), les macrophages (144), les neutrophiles (145) ou encore les lymphocytes B (146).

### 3.1.2 Induction de la production d'IL-4 et d'IL-13

En plus de la production de cytokines de type Th1, il a été démontré que, en présence d'IL-18, les lymphocytes T naïfs sont capables de produire de l'IL-13 et du GM-CSF. Cet effet se fait notamment en collaboration avec l'IL-2 (147). Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs, cultivés en présence de ces deux cytokines, expriment le CD40L et produisent une grande quantité d'IL-13 et une quantité moindre d'IL-4 (148). Chez les mastocytes et basophiles, cellules considérées comme participant à la réponse de type Th2, une stimulation par de l'IL-18 et de l'IL-3 conduit à la production d'une quantité importante d'IL-4 et d'IL-13 (149). Les NKT, quant à eux, sont des cellules, tout comme les éosinophiles, capables de produire des cytokines soit de type Th1, soit de type Th2. Chez ces cellules, l'IL-18 entraîne non seulement la libération d'IFN $\gamma$ , mais également d'IL-4 (150). Il semble notamment que cette polarisation soit temps-dépendante (142).

### 3.1.3 Induction de la production d'IL-17

Plus récemment, l'implication de l'IL-18 dans les réponses de type Th17 a également été démontrée. En effet, les lymphocytes  $\gamma\delta$  expriment des taux importants d'IL-18R et la stimulation par d'IL-18, associée à l'IL-23 entraîne la production d'IL-17 chez ces cellules, mais aussi chez les lymphocytes CD4<sup>+</sup>, cela en absence d'un engagement du TCR (151). L'IL-18 contribue également à la différenciation de ces cellules lorsqu'elles sont activées par des ligands appropriés, comme les cristaux d'acide urique (152).

### 3.1.4 Régulation de la production d'IgE

Initialement, il a été démontré que la stimulation des lymphocytes B par une combinaison d'IL-18 et d'IL-12, conduit à une inhibition de la production d'IgE et d'IgG1 et une augmentation de la production d'IgG2a dans un modèle murin d'infection parasitaire par un helminthe, *Nippostrongylus brasiliensis* (153). Cependant, l'administration d'IL-18 seule induit la production de cytokine Th2, une éosinophilie et une réponse IgE dans des modèles murins d'allergie et d'infection parasitaire (148,154). Cette accumulation d'IgE induite par l'IL-18 s'observe également dans des modèles murins non pathologiques (155).

### 3.2. Augmentation de l'activité cytotoxique

L'IL-18 est capable, à elle-seule, d'augmenter les activités cytotoxiques des cellules NK et des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> (106,129,136). Ces cellules exercent leur action par l'utilisation de molécules telles que la perforine, FasL et TRAIL (TNF-related-apoptosis-inducing ligand). L'IL-18 régule positivement l'expression de la perforine et de FasL mais n'augmente pas l'expression de TRAIL (156–158).

Récemment, il a été démontré que l'IL-18 est également capable d'augmenter la cytotoxicité dépendante des anticorps des cellules NK par la stimulation de leurs FcR *in vitro* et *in vivo* (159).

### 3.3. IL-18 et éosinophiles

La relation entre les éosinophiles et l'IL-18 n'a que très peu été étudiée. Cependant, dans des modèles murins d'asthme allergique, l'administration d'IL-18 conduit à une accumulation d'éosinophiles au niveau du poumon (154,160), suggérant que cette cytokine pourrait exercer un effet direct ou indirect sur ces cellules. De plus, les éosinophiles expriment l'IL-18R $\alpha$  (161). Une stimulation par de l'IL-18 entraîne la sécrétion d'IL-6, d'IL-8 de CXCL8 et de CCL2 (161,162). Elle augmente également significativement la survie des éosinophiles (162).

## 4. IL-18 et tractus gastro-intestinal

De par ses nombreuses activités biologiques, l'IL-18 intervient dans de nombreuses pathologies inflammatoires, auto-immunes, allergiques ou cancéreuses. Cette action peut-être également bénéfique ou délétère selon les contextes. Nous avons donc choisis de nous focaliser sur le rôle de l'IL-18 au niveau d'un organe, le tube digestif. En effet, celui-ci est représentatif de la diversité fonctionnelle de l'IL-18 puisqu'elle participe à la fois à l'homéostasie, à l'inflammation et à l'immunité anti-tumorale au niveau de cet organe.

#### 4.1. Homéostasie intestinale

L'IL-18 participe aux processus de tolérance immune, de réparation et de prolifération des lymphocytes intra-épithéliaux importants dans l'homéostasie intestinale. L'IL-18 ainsi que la caspase-1 sont détectées au niveau de tout le tractus gastro-intestinal, suggérant que des taux importants d'IL-18 mature peuvent y être sécrétés (163). La synthèse d'IL-18 dans l'intestin et le côlon se fait au niveau des entérocytes et des cellules à mucus des villosités du grêle et de la partie apicale des cryptes coliques (164). Cette synthèse participe notamment à l'apoptose se produisant lors du processus physiologique de renouvellement cellulaire. En effet, les cellules épithéliales normales expriment la molécule Fas et sont sensibles à FasL entraînant leur apoptose (165,166). La sécrétion locale d'IL-18 peut donc promouvoir la mort des cellules épithéliales apicales.

La muqueuse intestinale fait face à un environnement riche en antigènes, tels que le microbiote intestinal ou les composants nutritifs, contrôlé par le système immunitaire qui assure une tolérance, permettant l'homéostasie intestinale et donc l'intégrité de la barrière intestinale. Les cellules épithéliales intestinales sont reconnues comme des cellules présentatrices des antigènes (CPA) non-professionnelles, capables de capturer, préparer et présenter les antigènes via leurs molécules de la classe du CMH I ou II et leurs molécules de co-stimulation CD40, CD58 ou CD86 (167). La production d'IL-18 par ces cellules renforce leurs similarités avec les CPA professionnelles. De plus, l'IFN $\gamma$  augmente l'expression de molécules de CMH II sur les cellules épithéliales intestinales (168). L'IL-18R est présent sur les cellules de la lamina propria du côlon sain et sur les lymphocytes intra-épithéliaux et l'IL-18, libérée par les cellules épithéliales, permet leur prolifération (169).

Un dernier argument en faveur du rôle de l'IL-18 dans l'homéostasie intestinale est le fait qu'on ne retrouve pas cette cytokine au niveau du tractus gastro-intestinal fœtal (non soumises aux antigènes environnementaux) (164).

#### 4.2. Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin

Tout comme les éosinophiles, l'IL-18 semble avoir un rôle à la fois bénéfique et délétère dans les MICI. En effet, des résultats paradoxaux ont été obtenus dans différents modèles murins dans lesquels l'absence d'IL-18 ou sa sur-expression conduit à une

inflammation exacerbée (170). Cela semble notamment dépendre du caractère aigu ou chronique de la colite ainsi que des cellules activées par l'IL-18 (171).

#### 4.2.1 Rôle néfaste....

Les premières études immunohistochimiques ont montré une expression d'IL-18 et de caspase-1 augmentée au niveau des lésions sur des pièces opératoires coliques des patients atteints de MICI, à la fois au niveau des cellules épithéliales et des cellules présentes dans la lamina propria (163). Ces sites présentent aussi une synthèse importante de cytokines induites par l'IL-18, telles que l'IFN $\gamma$ , l'IL-1 $\beta$ , le TNF et l'IL-8 (163). Un changement d'expression d'IL-18 est observé chez ces patients lorsque la pathologie devient plus sévère. Cette expression passe de l'épithélium à la lamina propria avec la sévérité de la maladie (172). Ces résultats, obtenus chez l'homme, suggèrent le rôle néfaste de l'IL-18. Ils sont en accord avec certaines études *in vivo*. En effet, des souris présentant une diminution de l'expression d'IL-18, *casp1*<sup>-/-</sup> ou après traitement par de l'IL-18BP, semblent résistantes au traitement par DSS et présentent une diminution de la production d'IL-1 $\alpha$ , d'IL-1 $\beta$ , d'IFN $\gamma$  et de TNF par les cellules immunes (173,174). De plus, chez un modèle murin transgénique pour l'IL-18, une susceptibilité accrue pour la colite a été observée, notamment due à une augmentation de l'infiltrat macrophagique (175).

#### 4.2.2 ...ou rôle bénéfique ?

A l'inverse, de récentes études décrivent un rôle protecteur de l'IL-18 dans ces pathologies. Les souris *Il18*<sup>-/-</sup> et *Il18ra*<sup>-/-</sup> développent une colite plus sévère en terme de morbidité et de mortalité que les souris wild type (WT) (176). Ce résultat a été renforcé par une étude montrant une augmentation de la susceptibilité à une colite induite par DSS chez des souris *Myd88*<sup>-/-</sup> (177). La production d'IL-18 est indissociable de l'inflammasome NLRP3. Plusieurs études ont démontré que les souris déficientes en NLRP3 sont très susceptibles à développer une colite et qu'un traitement par l'IL-18 diminue significativement cette colite (178,179). De plus les souris *Nlrp3*<sup>-/-</sup> reconstituées avec des cellules hématopoïétiques de souris WT développent une colite sévère alors que les souris WT recevant des cellules de moelle osseuse provenant de souris *Nlrp3*<sup>-/-</sup> ne présentent qu'une colite modérée (178). Cela suggère que la libération d'IL-18 par les cellules épithéliales

pourrait être bénéfique dans la prévention de la colite, notamment par le maintien de l'intégrité de la barrière intestinale.

#### 4.3. Cancer colorectal

Nous avons vu précédemment que l'IL-18 est capable de moduler la réponse immunitaire, d'augmenter la cytotoxicité cellulaire et de promouvoir les processus inflammatoires. Cela suggère qu'elle pourrait jouer un rôle important dans l'immunité anti-tumorale. Cet effet anti-tumoral a notamment été décrit dans de nombreux modèles animaux de mélanome, lymphome, sarcome ou carcinome (180–184).

Le cancer colorectal est une complication courante et majeure des MICI (185). Le traitement par DSS + Azoxymethane (AOM) chez la souris ou le rat est un modèle bien caractérisé pour cette pathologie. Les souris *Il18*<sup>-/-</sup>, *Myd88*<sup>-/-</sup>, *Il18ra*<sup>-/-</sup> ou *Nlrp3*<sup>-/-</sup> soumises à ce traitement sont hautement susceptibles de développer un cancer colorectal (186,187). L'administration exogène d'IL-18 prévient ce phénomène (187). Au contraire, les souris *Il1rl*<sup>-/-</sup> développent un nombre identique de tumeurs que leurs WT, soulignant le rôle unique de l'IL-18 dans ce processus (187).

A la différence du mécanisme observé dans les MICI, dans lesquelles le rôle bénéfique de l'IL-18 serait lié aux cellules épithéliales, les expériences utilisant des chimères ont démontré que seul le compartiment hématologique est nécessaire à la protection contre le cancer colorectal (188). Cet effet a également été observé dans d'autres modèles animaux consistant en l'injection de cellules tumorales. Dans ces modèles, l'administration d'IL-18 permet d'augmenter le rejet des cellules tumorales par les cellules immunitaires (182,183,189). L'IL-18 permettrait, dans ce contexte, une cytotoxicité dépendante de FasL, une libération d'IFN $\gamma$  ainsi qu'une inhibition de l'angiogenèse (163,190,191). Les cellules effectrices impliquées dans cet effet bénéfique de l'IL-18 sur l'immunité anti-tumorale semble être les cellules NK et les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> (163,192,193). Cependant, l'implication des autres cellules n'a pas été étudiée.

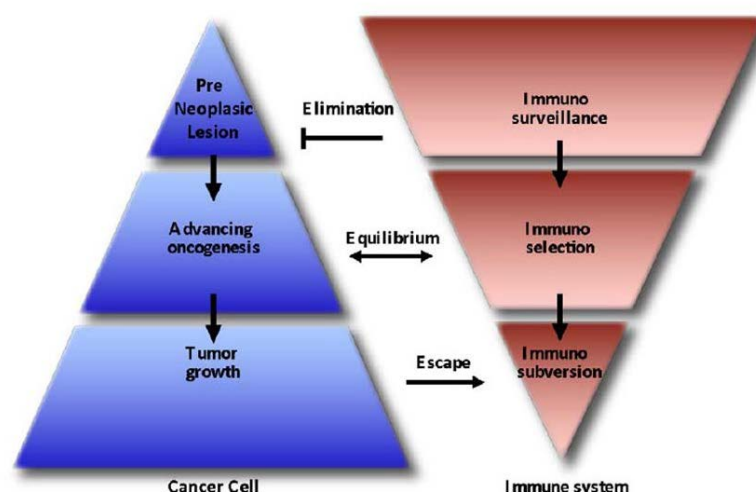


### III. Immunité anti-tumorale et éosinophiles

#### 1. Généralités

La découverte de l'immunité anti-tumorale prend naissance au XIX<sup>ème</sup> siècle, lorsque William B. Coley, constate une corrélation entre la régression de sarcomes osseux et la survenue de surinfection post-opératoire. Cette constatation a été à l'origine de l'hypothèse selon laquelle un dysfonctionnement du système immunitaire pouvait accompagner le processus de cancérisation. On doit à Paul Ehrlich, qui a également découvert les éosinophiles, d'être l'un des premiers à émettre la théorie d'immunosurveillance, théorie reprise par Burnet et Thomas, à partir des années 70, alors définie en ces termes : « surveillance permanente de l'organisme par le système immunitaire pour reconnaître et détruire toutes les cellules anormales ». Actuellement, le concept de 'cancer immunoediting' (ou théorie des 3E) a prolongé cette hypothèse (Fig. 13) (194). Il caractérise l'interaction entre cellules tumorales et cellules immunitaires en trois phases :

- **Phase d'élimination** continue des cellules cancéreuses au fur et à mesure de leur apparition par le système immunitaire.
- **Phase d'équilibre** pendant laquelle les cellules cancéreuses ne sont plus éradiquées mais sous contrôle.
- **Phase d'échappement** des cellules cancéreuses au contrôle immunologique. Cette phase est la seule à être cliniquement visible.



**Figure 13 : Concept d'immunoediting.**

Figure tirée de Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting : from immunosurveillance to tumor escape. Nat Immunol, 2002.

### 1.1. Arguments épidémiologiques, cliniques et expérimentaux

Les arguments en faveur d'un rôle du système immunitaire dans la surveillance et le contrôle de la prolifération des tumeurs sont nombreux. Tout d'abord, les cancers sont plus fréquents chez les personnes âgées, le très jeune enfant ou le sujet immunodéprimé. C'est en particulier le cas pour les tumeurs associées à des virus, observées chez des patients traités par des immunosuppresseurs. De nombreuses études ont établi une corrélation positive entre le statut immunodéprimé du patient et l'augmentation du risque de développer un cancer (195). De même, beaucoup de données ont été apportées grâce à l'utilisation de souris immunodéficientes plus susceptibles de développer des tumeurs (induites chimiquement ou spontanées) (194). On peut également souligner la découverte, au cours d'autopsies, de tumeurs cliniquement silencieuses, ou encore l'observation de régressions spontanées de tumeurs, confirmée par des données anatomo-pathologiques (196). Un autre argument est le fait que, lors d'une allogreffe de moelle osseuse, le risque de rechute est plus faible si le greffon n'est pas déplété en lymphocyte T.

### 1.2. Effecteurs immunologiques

Une cellule tumorale présente une croissance infinie, un arrêt de différenciation, une perte d'inhibition de contact et l'acquisition d'un phénotype invasif. Le développement d'un cancer dépend bien sûr de ces propriétés mais également du microenvironnement tumoral qui est caractérisé par des facteurs libérés par la tumeur mais aussi par les autres cellules proches, dont les leucocytes (Fig. 12). L'infiltration de ces cellules peut être associée à un pronostic favorable ou défavorable.

#### 1.2.1 Cellules de l'immunité adaptative

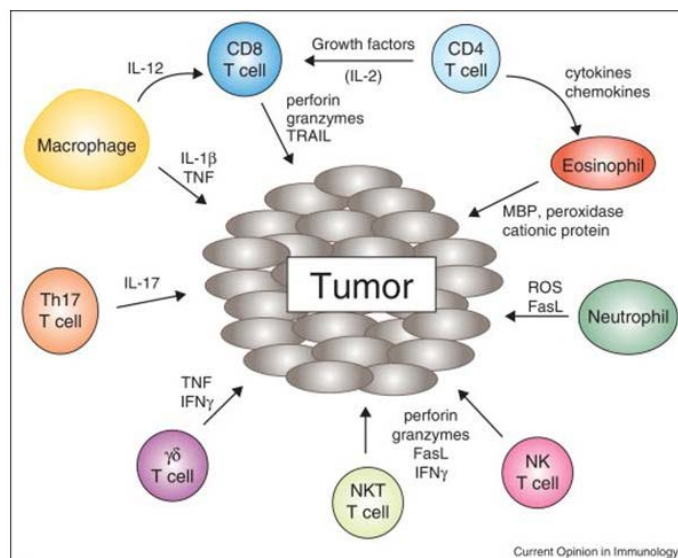
A la différence de l'immunité innée, l'immunité adaptative nécessite une phase d'apprentissage et est spécifique d'un antigène. La découverte des antigènes des tumeurs a constitué une étape essentielle dans l'immunologie anti-tumorale (197). Ces antigènes, spécifiques ou non des tumeurs sont reconnus par les lymphocytes B et T.

### a. Les lymphocytes T

L'infiltration de ces lymphocytes est généralement corrélée à un bon pronostic (198). Ces cellules, et notamment les lymphocytes T CD8<sup>+</sup>, sont certainement les cellules les plus étudiées dans ce contexte. Les lymphocytes T sont différenciés en lymphocytes CD8<sup>+</sup> cytotoxiques et CD4<sup>+</sup> après interaction avec les cellules présentatrices d'antigène. Les lymphocytes CD8<sup>+</sup> sont capables de détruire directement la cellule cible tumorale, si celle-ci exprime les molécules du CMH de classe I, par la libération de nombreux médiateurs (par exemple, les perforines et les granzymes). Quant aux lymphocytes CD4<sup>+</sup>, ils exercent leur fonction anti-tumorale grâce au relargage de cytokines : la plupart des études se sont focalisées sur les lymphocytes de type Th1 car libérant des molécules anti-tumorales connues telles que l'IFN $\gamma$ , le TNF ou l'IL-2, cependant, d'autres données montrent qu'une réponse Th2 pourrait aussi jouer un rôle dans l'immunité anti-tumorale (199,200).

### b. Les lymphocytes B et anticorps

Le rôle de la réponse humorale contre les tumeurs n'est pas encore clairement établi. L'interaction, au niveau des ganglions lymphatiques, entre des cellules présentatrices d'antigène (présentant des antigènes tumoraux) et des lymphocytes B aboutissent à la prolifération et à l'expansion clonale de ces derniers en plasmocytes qui vont sécréter des immunoglobulines (201). Une fois ces anticorps fixés sur les cellules tumorales, ils peuvent activer les autres types cellulaires par un mécanisme de cytotoxicité dépendant des anticorps.



**Figure 14 : Leucocytes impliqués dans l'immunité anti-tumorale**

Figure tirée de Darcy PK, Neeson P, Yong CS, Kershaw MH. Manipulating immune cells for adoptive immunotherapy of cancer. Curr Opin Immunol. 2014

### 1.2.2 Cellules de l'immunité innée

#### a. Les cellules Natural Killer (NK)

Comme les lymphocytes, une accumulation de cellules NK au sein des tumeurs est associée à un pronostic favorable (202). Les cellules NK sont complémentaires des lymphocytes T cytotoxiques puisqu'elles sont activées par des mécanismes à l'exact opposé l'un de l'autre. En effet, alors que l'activité des lymphocytes nécessite la présence du CMH-I à la surface des cellules tumorales, c'est son absence qui prive la cellule NK de signaux inhibiteurs, entraînant la libération des médiateurs cytotoxiques, de FasL et ainsi la destruction de la cellule cible (203).

#### b. Les macrophages

Les macrophages infiltrant la tumeur sont une des populations leucocytaires les plus nombreuses. Leur fonction pro- ou anti-tumorale n'est pas encore complètement comprise. En effet, il existe deux sous-type de macrophages, les M1 (dits classiques) et les M2 (dits alternativement activés), qui diffèrent en termes d'expression de récepteurs, de fonctions effectrices et de libération de médiateurs (204). Selon leur polarisation, ils pourraient agir à l'opposé sur la cancérogénèse, et sur la progression tumorale (viabilité cellulaire, angiogénèse, fibrose et développement de métastases), cette polarisation étant médiée par le microenvironnement tumoral (205).

#### c. Autres cellules

Evidemment de nombreux autres types cellulaires sont impliqués dans l'immunité anti-tumorale avec des effets différents selon le contexte clinique. Les lymphocytes T NK (NKT) et les lymphocytes  $\gamma\delta$ , considérés comme des lymphocytes non conventionnels, jouent un rôle important. Les premiers se caractérisent par l'expression des récepteurs de surface des cellules NK et par un répertoire restreint à la reconnaissance de lipides et glycolipides présentés par le CD1d (molécule apparentée au CMH-I). Ils agissent par la libération d'IFN $\gamma$  et d'IL-4 ainsi que par la production de médiateurs cytotoxiques (perforines, granzymes) (206). Les seconds reconnaissent les phosphoantigènes exprimés par les cellules tumorales et sont capables de lyse cellulaire par l'expression de récepteurs tel que le NKG2D et par l'expression d'IFN $\gamma$  et de TNF (206).

Les polynucléaires neutrophiles, quant à eux, pourraient jouer un rôle direct dans la mort de cellules cancéreuses en utilisant des mécanismes tels que la liaison Fas/Fas-Ligand ou la libération de ROS (206). En ce qui concerne les mastocytes, leur rôle est plus controversé. Bien que leur infiltration soit de bon pronostic dans quelques types de tumeurs, cancer du sein hormono-dépendant ou de la prostate, ils sont plus généralement associés à un pronostic défavorable en terme de survie et de récurrence (207). Leur action bénéfique pourrait s'exercer par un mécanisme d'ADCC via la reconnaissance d'IgE fixées sur les cellules tumorales.

## **2. Implication des éosinophiles dans l'immunité anti-tumorale**

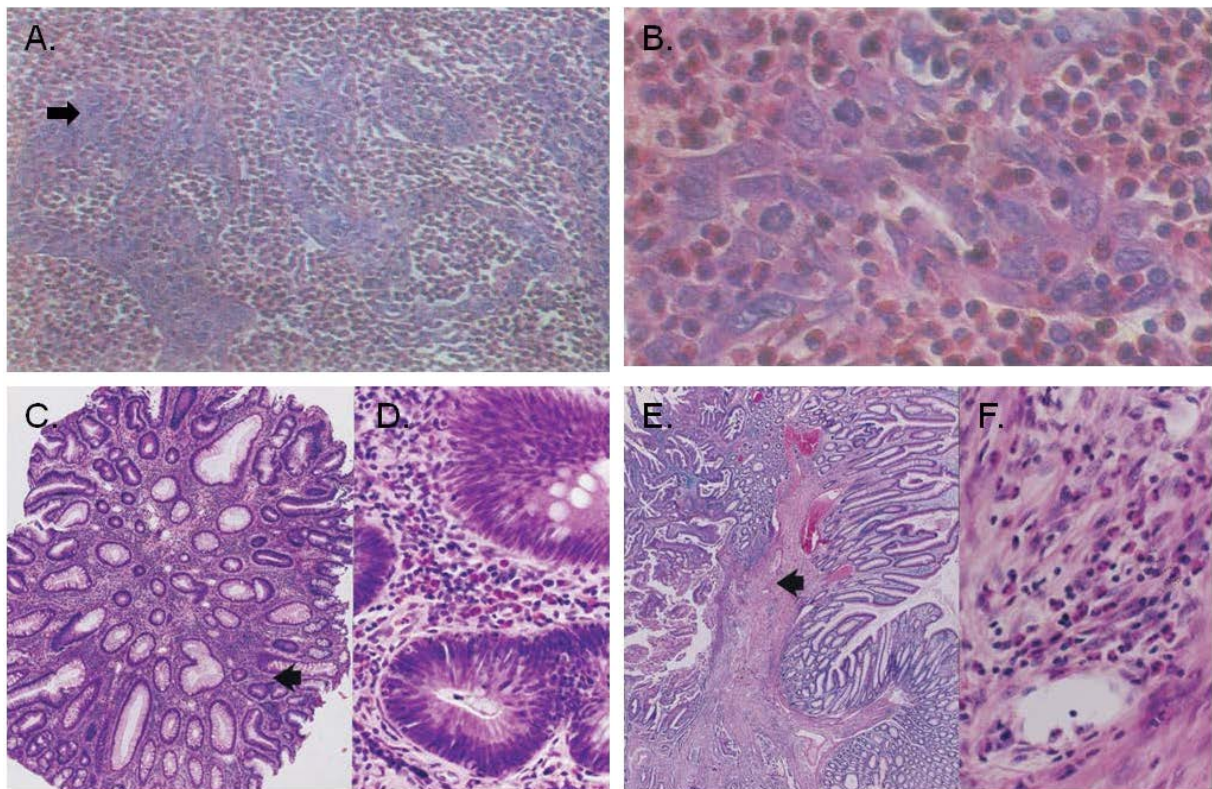
Cette partie a fait l'objet d'une publication en 2012 dans *Cancer Immunology Immunotherapy* (Annexe I). Il est à noter que cet article s'intégrait, avec d'autres, dans un numéro spécial, qui avait pour thématique le concept d'Allergo-Oncologie, concept plus détaillé dans le paragraphe III.2.4. (p.52).

### **2.1. Conséquences anatomo-pathologies des TATEs**

#### **2.1.1 Définition**

Les polynucléaires éosinophiles sont observés au niveau des infiltrats péri-tumoraux de nombreux types de cancers, que ce soit des cancers hématologiques ou solides (208). Cette infiltration est appelée TATE pour "Tumor-Associated Tissue Eosinophilia", terme utilisé pour la première fois en 1981 (209). Il est intéressant de noter que ces éosinophiles sont observés, selon le type de cancer ou selon le stade de la pathologie au niveau de la tumeur et/ou du stroma peri-tumoral ou encore au niveau de la zone transitionnelle (Figure 15). Bien que la relation entre cette éosinophilie tissulaire et le devenir clinique des patients ne soit pas encore réellement comprise, plusieurs études se sont intéressées à décrire la valeur pronostique de cette TATE, dans le but de démontrer, au moins indirectement, le rôle potentiel pro- ou anti-tumoral des éosinophiles. En effet, une augmentation du nombre des éosinophiles, tissulaires ou sanguins peut être associée à une valeur pronostique soit favorable soit défavorable. Plusieurs raisons, qu'elles soient « naturelles » (facteurs de pronostique dépendants de la pathologie) ou expérimentales (choix de la méthode d'analyse), peuvent expliquer cette dichotomie :

- 1) Le potentiel pro- ou anti-tumoral des éosinophiles semble dépendre du type tumoral ainsi que du stade de développement de la tumeur.
- 2) La méthode de comptage de ces cellules n'est pas standardisée et peut donc varier d'une étude à l'autre. Classiquement, les TATEs sont subdivisées en trois groupes : faibles, moyennes ou fortes selon le nombre d'éosinophiles comptés à fort grossissement (x400). Les critères de Lowe considèrent les limites à <10, entre 10 et 100, et >100 nombres d'éosinophiles par sections HPF (High Power Field) comptés dans au moins dix champs (210). Une autre méthode consiste à déterminer la force d'infiltration, c'est la méthode de densité (211,212) : toutes les biopsies sont étudiées dans leur globalité (tumeur et stroma). Le nombre total d'éosinophiles est ensuite divisé par l'aire totale de l'échantillon, donnant un nombre d'éosinophiles / mm<sup>3</sup>.
- 3) Le manque du pouvoir statistique de ces données par les faibles effectifs étudiés dans certaines études.



**Figure 15: Représentation histologique des TATEs.**

Après coloration à l'hémaréose et éosine, la présence d'éosinophile est évaluée dans un carcinome utérin (A et B) et dans des carcinomes coliques (C-F). B, D, F sont des vues à plus fort grossissement de, respectivement A, C et E. Selon la tumeur, les éosinophiles sont retrouvés au niveau de la tumeur et du stroma tumoral (A-B), au niveau du stroma (C-D) ou au niveau de la zone marginale (E-F).

Figure adaptée de Lowe D, Jorizzo J, Hutt MS. Tumour-associated eosinophilia : a review. J Clin Pathol. 1981 et de Moezzi J, Gopalswamy N, Haas RJ, Market RJ, Suryaprasad S, Bhutani MS. Stromal eosinophilia in colonic epithelial neoplasms. 2000

Dans cette partie, nous nous attacherons à tenter de décrire ces différentes études épidémiologiques s'intéressant à la valeur pronostique de la présence d'une TATE.

### 2.1.2 Valeur pronostique favorable

#### a. Tumeurs du tube digestif

Le type de cancer pour lequel la valeur pronostique d'une éosinophilie tissulaire a été le plus étudiée est le cancer du côlon. En effet, dès 1983, Pretlow et *al.* ont étudié l'influence d'une infiltration d'éosinophiles sur le pronostic et le développement de métastases chez des patients atteints de carcinome de côlon (213). Dans cette étude, les sujets qui présentent une forte infiltration d'éosinophiles ont une diminution significative de l'incidence de métastases (23.5% vs 62.0%). Par conséquent, ces patients ont également un meilleur pronostic. En ce qui concerne les groupes sans métastase, dix-huit mois après résection tumorale, tous les patients ayant un nombre élevé d'éosinophiles au niveau du stroma tumoral, survivent contre seulement 73.7% des patients de l'autre groupe (213). Ces résultats, bien qu'intéressants, étaient préliminaires, en raison du petit nombre de sujets (n=24) et à la courte période de suivi. Néanmoins, ces données ont été, par la suite, confirmées par d'autres études.

Dans une étude incluant 126 sujets, après une période de suivi de cinq années, les patients ayant un nombre élevé d'éosinophiles au sein de la tumeur, ont un meilleur pronostic que ceux ayant un taux plus faible (214). De plus, cette influence bénéfique est indépendante des autres facteurs classiques de pronostic, comme le stade tumoral selon la classification de Duke, l'âge des patients, le grade histologique, la vascularisation et l'invasion vasculaire. Cette valeur pronostique favorable d'une TATE indépendante du stade de Duke a également été faite par Nielsen et *al.* sur une cohorte de 584 patients avec la même période de suivi (215). Dans cette étude, les auteurs ont stratifié l'infiltration en quatre grades (<30 ; 30-54 ; 55-90 ; >90). Il apparaît que le taux de survie augmente significativement avec la quantité d'éosinophiles au sein de la tumeur.

Il est à noter qu'une étude multicentrique, portant sur plus de 10 000 sujets, s'est également intéressée à la relation entre le nombre d'éosinophiles circulants et l'incidence du cancer du côlon. Les auteurs ont montré une corrélation inverse entre le taux d'éosinophiles et l'apparition de ce cancer (216).



La valeur pronostique de la présence d'une TATE a également été étudiée pour les tumeurs des autres éléments du tube digestif. Dans le cas du carcinome de l'œsophage sans invasion vasculaire, métastase ganglionnaire ou récurrence clinique, un nombre plus important d'éosinophiles associés à la tumeur sont retrouvés (217), suggérant une possible corrélation entre la TATE et un comportement moins agressif de la tumeur. Au niveau gastrique, dans une étude statistique multivariée, un taux élevé d'éosinophiles est associé à une réduction du risque de décès de plus de 50% (218). Enfin, un nombre élevé d'éosinophiles est significativement associé à un taux de survie plus important et à une diminution de l'apparition de métastases chez les patients souffrant d'un cancer rectal (219).

#### *b. Autres tumeurs*

Les mêmes conclusions ont également été proposées dans le cas de carcinomes oraux de cellules squameuses. En effet, parmi 125 patients atteints de ce cancer, la présence d'une TATE importante est associée à un pronostic favorable et le rôle de ces éosinophiles tissulaires est indépendant des autres facteurs pronostiques comme l'âge, le sexe, la consommation d'alcool ou de tabac, le site tumoral, le stade clinique et l'embolisation vasculaire (211).

Dans le carcinome du nasopharynx, le taux de survie est meilleur lorsque l'infiltration tissulaire des éosinophiles est importante, bien que cette différence ne soit pas statistiquement significative (220). Cependant, cette différence devient significative dans le sous-groupe de patients de mauvais pronostic, défini par l'expression de "l'Epidermal Growth Factor Receptor" (EGFR) sur les cellules tumorales (220).

En ce qui concerne le cancer du pénis, la présence d'une TATE n'a pas d'influence sur la survie des patients ayant un cancer de stade I et II (classification TNM). Cependant, pour les stades avancés de la pathologie (III et IV), la survie tend à être meilleure chez le groupe présentant des éosinophiles au niveau du stroma que les patients n'en ayant pas (60% vs 0% à 5 ans) (221). Une augmentation des éosinophiles tissulaires a également été associée à un bon pronostic dans le carcinome du pharynx, l'adénocarcinome pulmonaire ou encore le cancer de la vessie (201).

Enfin, bien que des infiltrats éosinophiliques aient été détectés au niveau des tissus d'une grande majorité de tumeurs, aucun n'a pu être observé dans le cancer de la prostate. Cependant, des cristalloïdes d'éosinophiles ont été détectés au niveau des tissus de la prostate, et cette présence est inversement corrélée avec le score histologique de Gleason (222).



### 2.1.3 Valeur pronostique défavorable

Toutes les données précédentes montrent que les TATEs sont plutôt associées à une réponse anti-tumorale bénéfique, particulièrement dans le cas des tumeurs solides. A l'inverse, la présence d'une TATE apparaît être associée à un pronostic défavorable dans la maladie de Hodgkin. Bien que plusieurs études aient rapporté la relation entre la présence d'une TATE et le pronostic de la maladie de Hodgkin, l'approche la plus complète a été publiée par von Wasielewski et *al.* et porte sur 1511 biopsies de lymphome de Hodgkin (223). L'éosinophilie tissulaire, observée dans 38% des cas, diffère selon le type histologique de ce lymphome: 0% pour la forme à prédominance lymphocytaire, 40% à 55% dans la forme scléro-nodulaire, 43% pour la forme à cellularité mixte, et 54% pour la forme sans lymphocyte. Dans cette étude, une analyse multivariée montre que la présence d'une TATE est le facteur de pronostic défavorable le plus important pour la survie dans la forme scléro-nodulaire du lymphome de Hodgkin. Au contraire, aucun effet significatif lié à l'éosinophilie sur la survie n'a été démontrée dans le type cellulaire mixte (223).

Cette pathologie est considérée comme un type particulier d'un lymphome B caractérisé par la prolifération de cellules de Reed-Sternberg au sein d'un tissu lymphoïde d'architecture réactionnelle particulière. Le phénotype de ces cellules est caractérisé par l'expression du CD30 à leur membrane. L'interaction entre le CD30-ligand, sécrété notamment par les éosinophiles, et le CD30, présent sur les cellules de Reed-Sternberg, est connue pour induire des signaux anti-apoptotique et de prolifération (224). Cependant, cela n'explique pas la différence de la signification clinique entre l'éosinophilie et les catégories histologiques. Bien qu'un polymorphisme allélique de l'ECP ait été associé au sous-type de sclérose nodulaire (225,226), les mécanismes reliant un effet négatif de la présence d'une TATE dans le sous-type scléro-nodulaire de la maladie de Hodgkin ne sont pas encore élucidés.

## 2.2. Recrutement des éosinophiles aux sites tumoraux

Les mécanismes qui contrôlent le recrutement des éosinophiles jusqu'aux sites tumoraux ne sont pas encore clairement établis. Comme nous avons pu le voir précédemment, ces cellules expriment de nombreux récepteurs aux chimiokines à leur surface (cf. § I.3.3 p.6), plusieurs médiateurs chimiotactiques pourraient donc être impliqués dans cette migration.

### 2.2.1 Rôle des chimiokines

Tout d'abord, certaines cellules tumorales ont été identifiées comme étant une source importante d'IL-5 et/ou d'IL-3, facteurs qui agissent sur la différenciation médullaire et la migration des éosinophiles. C'est notamment le cas des cancers de la glande thyroïde (227), du foie (228) et de la vessie (229).

Une autre chimiokine, sélective des éosinophiles, pourrait également participer à leur recrutement : l'éotaxine (CCL11). Chez l'Homme, une des premières études à démontrer une corrélation entre le recrutement des éosinophiles et l'expression tissulaire d'éotaxine a été faite dans la maladie de Hodgkin (230). Au contraire, aucune corrélation significative n'a pu être établie entre la présence de TATE et les taux d'IP-10 (CXCL10), de RANTES ou de MIP-1 $\alpha$ . Les cellules tumorales ne sont pas la seule source d'éotaxine. En effet, dans le carcinome des cellules squameuses de la cavité orale, la principale source d'éotaxine sont les éosinophiles eux-mêmes (231), montrant une voie autocrine et/ou paracrine pour une accumulation locale de ces cellules. Il pourrait être également envisageable que cette chimiokine contribue plus à la maintenance de l'éosinophile tissulaire dans ces pathologies que dans l'initiation de cette migration.

Thielen et *al.* ont étudié l'interaction entre les différentes chimiokines et la TATE dans 50 cas de lymphomes T périphériques (232). Ils ont démontré une corrélation significative entre la présence d'éosinophiles intra-tumoraux et l'expression d'IL-5 et de TARC (CCL17), mais pas entre la TATE et RANTES et l'éotaxine. Ainsi, la libération de chimioattractants pour les éosinophiles pourrait être spécifique au type tumoral.

### 2.2.2 Rôle des DAMPs ou alarmines

Les recherches sur la localisation des éosinophiles au sein même des tumeurs pourraient également aider à comprendre leur recrutement. Ces cellules peuvent prendre part à l'immunité innée dans les réponses anti-tumorales, notamment en reconnaissant les DAMPs (cristaux d'acide urique, ATP...), qui sont typiquement libérés après la nécrose tumorale. Les cellules cancéreuses en apoptose induisent également la migration des éosinophiles *in vitro* et *in vivo* (27,233). Cormier et *al.* ont démontré que l'infiltration des tumeurs par les éosinophiles est un phénomène précoce, persistant et spatialement restreint (233). Après injection sous-cutanée de cellules de mélanome à des souris, une éosinophilie apparaît au niveau des régions nécrotiques et de la capsule (zone fibreuse acellulaire) comparée aux zones

des cellules tumorales viables. L'évaluation quantitative du recrutement des éosinophiles a montré que cette infiltration tissulaire est médiée par des facteurs (tels que les DAMPs) libérés directement par les tissus nécrotiques tumoraux (234). Toutes ces données suggèrent que les DAMPs ou alarmines contribuent à l'immunité anti-tumorale notamment par le recrutement et l'activation des polynucléaires éosinophiles au sein des tumeurs. Une de ces molécules est la HMGB1 (High Mobility Group Box 1). L'HMGB1 est une alarmine car libérée seulement par les cellules nécrotiques et pas par les cellules en apoptose (235). Lofti *et al.* ont mis en évidence que les éosinophiles expriment le RAGE (Receptor for Advanced Glycation End products), un des premiers récepteurs définis pour la HMGB1. Cette alarmine est chimioattractante et induit leur dégranulation (236). L'IL-33 (une autre alarmine) pourrait également agir dans ce contexte. En effet, le taux d'IL-33 sérique est augmenté dans le cancer de l'estomac (237), et cette cytokine est connue pour recruter les éosinophiles *in vivo* (238). Récemment, une équipe a mis en évidence l'effet de cette alarmine dans la défense contre le cancer du côlon, avec un rôle prépondérant des lymphocytes innés ILC2 et des éosinophiles (239).

Considérées dans leur ensemble, toutes ces études montrent que les facteurs chimioattractants, influençant la migration des éosinophiles dans le cadre du développement tumoral, apparaissent dépendre du type de cancer ainsi que du stade de la pathologie.

### 2.3. Propriétés tumoricides des éosinophiles

Bien que les TATEs soient souvent associées à une valeur pronostique favorable, le rôle exact des éosinophiles dans la réponse anti-tumorale est encore très mal connu. Les éosinophiles sont des leucocytes multifonctionnels capables de cytotoxicité et impliqués dans les processus inflammatoires, le remodelage tissulaire et la modulation des immunités innée et adaptative. Le fait qu'ils soient retrouvés activés (car dégranulés) directement en contact avec les cellules cancéreuses (240), suggère que leur potentiel de cytotoxicité pourrait engendrer une réduction de la croissance tumorale. Les approches d'immunothérapie, les études *in vivo* et *in vitro* suggèrent que les éosinophiles puissent être impliqués dans l'immunité anti-tumorale.

### 2.3.1 L'immunothérapie

L'éosinophilie est fréquemment observée durant les protocoles d'immunothérapie, particulièrement ceux utilisant l'IL-2 (241,242) et l'IL-4 (243,244). Cependant, l'impact de cette infiltration sur l'efficacité thérapeutique reste peu clair.

#### *a. L'interleukine-2*

L'immunothérapie par l'IL-2 est utilisée pour traiter certains types de cancers, comme les mélanomes et les carcinomes rénaux. L'efficacité thérapeutique de l'administration systémique d'IL-2 est associée à la présence d'éosinophiles dégranulés au sein de la tumeur, suggérant que ceux-ci pourraient être des cellules effectrices de cette réponse (241,242). Plusieurs hypothèses ont été avancées pour expliquer cette association. Tout d'abord, les éosinophiles peuvent induire directement la lyse tumorale par des mécanismes liés à l'immunité innée. Cela a été mis en évidence par Huland et *al.* qui ont montré que les éosinophiles libèrent le contenu de leurs granules sur les cellules de cancer de la vessie après traitement par l'IL-2. L'activation de ces éosinophiles pourrait également avoir lieu par un mécanisme dépendant des anticorps (245), tout comme par leur capacité à moduler le microenvironnement tumoral grâce à leurs propriétés immuno-régulatrices. Cependant, malgré leurs propriétés anti-tumorales, la valeur pronostique d'une éosinophilie tissulaire observée chez les patients traités par de l'IL-2 n'a pas encore été suffisamment étudiée.

#### *b. L'interleukine-4*

Concernant l'immunothérapie par l'IL-4, les études faites sur les modèles murins ont suggéré un lien entre les éosinophiles et la réponse thérapeutique anti-tumorale (244). Les phases 1 d'essais cliniques ont démontré que l'administration d'IL-4 aux patients atteints de cancers solides induit la dégranulation des éosinophiles de façon dose-dépendante, basée sur des taux augmentés de MBP dans le sérum et les urines (243).

#### *c. L'interleukine-25*

Plus récemment, il a été démontré que l'IL-25 (ou IL-17E) a aussi une activité anti-tumorale *in vivo*. En effet, l'administration d'IL-25 a montré une efficacité dans des modèles de xénogreffes de cancers humains, tels que le mélanome, le cancer du poumon, sein et côlon (246). Ces résultats démontrent que le traitement par l'IL-25 entraîne une éosinophilie, laquelle est corrélée à l'inhibition de la croissance tumorale (246). Cependant, le lien entre

l'efficacité thérapeutique et l'éosinophilie est principalement basé sur des analyses de corrélation, et aucune conclusion n'a pu être donnée sur les mécanismes d'action de ces éosinophiles dans la modulation de la croissance tumorale.

### 2.3.2 Données in vivo

Quelques études, menées chez l'animal, suggèrent un lien entre l'éradication des tumeurs et le recrutement d'éosinophiles. En 1992, Tepper et *al.* montrent que des cellules tumorales murines, modifiées pour produire de l'IL-4 par transfection, ont une tumorigénicité réduite ou absente lorsqu'elles sont réintroduites chez l'animal (244). L'injection de ces cellules induit un infiltrat tumoral composé principalement d'éosinophiles et de macrophages. Le rôle de l'IL-4 dans la cytotoxicité anti-tumorale a clairement été mis en évidence dans ce modèle (244).

Plus tard, dans un modèle de mélanome murin résistant aux lymphocytes T cytotoxiques, la disparition des métastases pulmonaires par les lymphocytes Th2 est sous le contrôle de l'éotaxine et du facteur de transcription STAT6 (Signal Transducer and Activator of Transcription 6). L'éradication de ces métastases est associée à un influx d'éosinophiles dégranulés au sein de la tumeur (199). Bien que l'incubation d'éosinophiles avec une lignée cellulaire de mélanome, les B16, n'entraîne pas de lyse de ces cellules, la cytotoxicité des lysats d'éosinophiles a été démontrée. De plus, un marquage immunohistochimique sur des sections de métastases pulmonaires ont montré la présence de MBP (199). Il apparaît donc que le microenvironnement tumoral peut fournir des signaux de dégranulation aux éosinophiles et de destruction tumorale. Néanmoins, une des limites de ces modèles est l'utilisation de cellules cancéreuses exprimant des cytokines ou de l'ovalbumine pour faciliter le développement d'une réponse Th2.

En utilisant un modèle différent avec des cellules tumorales non modifiées dans des souris de type sauvage, Cormier et *al.* ont étudié la fonction des éosinophiles dans un cadre plus physiologique. Ils montrent que l'infiltration de ces cellules est une réponse précoce et persistante (233).

Dans une autre étude, Simson et *al.* ont étudié le rôle des éosinophiles dans la surveillance tumorale dans plusieurs modèles murins de fibrosarcome génétiquement modifiés. Quand ils utilisent des souris transgéniques pour l'IL-5, qui ont des taux élevés d'éosinophiles, une diminution significative de l'incidence et de la croissance tumorale a été démontrée. Ce résultat est corrélé au taux d'éosinophiles au sein de la tumeur et au niveau du

tissu connectif l'entourant (247). Au contraire, une augmentation de l'incidence tumorale et un influx réduit d'éosinophiles a été observé chez des modèles murins avec des taux faibles d'éosinophiles (*Ccl11*<sup>-/-</sup>) ou déficients en éosinophiles (*Il5/Ccl11*<sup>-/-</sup> et  $\Delta$ dblGATA) (247).

Très récemment, L'IL-33 vient d'être présentée comme un nouvel acteur dans l'immunité anti-tumorale, notamment dans le cancer du côlon. Les acteurs principaux cellulaires impliqués dans cette réponse sont les éosinophiles et les ILC2 (239). En effet, les effets protecteurs de l'IL-33 sont corrélés au recrutement des éosinophiles au sein de la tumeur et le blocage de leur recrutement abolit son activité anti-tumorale (239).

### 2.3.3 Données in vitro

Si des expériences *in vivo* suggèrent un rôle des éosinophiles dans l'immunité anti-tumorale, les mécanismes impliqués restent mal compris. De même, ces études restent peu pertinentes du fait de la grande disparité morphologique, phénotypique et activatrice entre les éosinophiles murins et humains (248,249). Ainsi, les études effectuées *in vitro*, sur des prélèvements humains, permettent à la fois de confirmer le rôle cytotoxique anti-tumoral des éosinophiles mais également d'apporter des éléments de réponse quant aux mécanismes impliqués.

#### a. Mise en évidence de nouveaux récepteurs

La démonstration récente que les éosinophiles expriment des récepteurs et des médiateurs partagés avec les lymphocytes T cytotoxiques, connus pour être impliqués dans les réponses anti-tumorales, apporte des arguments supplémentaires en faveur du rôle tumoricide des éosinophiles. Munitz et *al.* ont mis en évidence que les éosinophiles expriment un récepteur 2B4 fonctionnel, faisant partie de la super-famille des immunoglobulines, sous-famille du CD2 et qui est également exprimé par les cellules T. L'activation des éosinophiles via le 2B4 entraîne une cytotoxicité vis-à-vis de deux lignées cellulaires tumorales (cellules de mastocytome murin P815 et des lignées cellulaires infectées par l'EBV (Epstein-Barr Virus), 721.221 B) (208). Plus récemment, des études faites dans notre laboratoire, mettent en évidence l'expression d'un autre récepteur, communs avec les lymphocytes T, le complexe CD3/TCR $\gamma\delta$  (36). Les lymphocytes  $\gamma\delta$  sont des acteurs centraux dans la défense contre le cancer, et leurs ligands, les phosphoantigènes, sont exprimés par de nombreuses cellules tumorales. L'activation des éosinophiles via ce récepteur entraîne la production d'espèces

réactives à l'oxygène (ROS) et la libération des protéines granulaires cytotoxiques, confirmant la fonctionnalité de ce récepteur.

#### *b. Activité cytotoxique des éosinophiles*

La première étude montrant une action cytotoxique direct des éosinophiles humains vis-à-vis de cellules tumorales a été effectué au sein de notre laboratoire (250).

Un contact entre ces deux types cellulaires est essentiel pour induire la cytotoxicité, démontré par le rôle des molécules d'adhérence CD11a/CD18 (LFA-1) dans ce processus cytolytique (250) et par les études de microscopie électronique (240). Ces études suggèrent l'existence d'un dialogue entre les éosinophiles et les cellules tumorales viables (36). Les médiateurs impliqués dans l'immunité anti-tumorale sont nombreux et inclus notamment l'ECP, l'EDN, le TNF (Tumor Necrosis Factor) et le granzyme A, produits par les éosinophiles. Ce dernier, qui est classiquement associé aux lymphocytes T cytotoxiques, a été récemment identifié dans les éosinophiles et agit en synergie avec la protéine cationique, ECP (250). Ces résultats *in vitro* suggèrent que, via leurs récepteurs et médiateurs impliqués dans la cytotoxicité tumorale, les éosinophiles participent aux réponses anti-tumorales.

### 2.4. Le concept d'Allergo-Oncologie

Le concept « d'Allergo-Oncologie », à la naissance duquel notre laboratoire a été directement associé (251), est basé sur la notion de relation positive entre allergies et cancers. Cette relation a été initialement démontrée par des études épidémiologiques ainsi que par la capacité des IgE à détruire les cellules cancéreuses après reconnaissance des antigènes tumoraux par un mécanisme d'ADCC. Notre laboratoire a démontré que les éosinophiles présentant à leur surface le FcεRI sont donc capables de fixer des IgE (65). De plus, il est connu que les éosinophiles issus de patients allergiques présentent plus d'IgE de surface (60), ce qui pourrait permettre d'expliquer en partie le potentiel cytotoxique anti-tumoral plus important.

#### 2.4.1 Relation allergie et cancers

Le débat s'intéressant à la relation entre l'allergie et le cancer n'est pas nouveau et reste valide. Deux hypothèses générales peuvent être considérées. La première est que

l'inflammation allergique augmente l'immunosurveillance tumorale, la rendant plus efficace. La seconde est qu'elle altère le fonctionnement du système immunitaire, promouvant le développement tumoral.

Tout d'abord, les études épidémiologiques ont cherché à démontrer une association entre un contexte d'allergie médiée par les IgE et les cancers. Ces études ont été résumées dans des revues récentes (252,253). Bien que les résultats ne soient pas parfaitement clairs, il y a plusieurs preuves qui suggèrent l'existence d'une relation inverse. Pour l'instant, les expériences faites chez les souris transgéniques pour l'IL-5 démontrent que la TATE est associée à une suppression des tumeurs, et pas à une augmentation de la vascularité et de la progression tumorale (247). Ces résultats suggèrent que les éosinophiles peuvent exercer leurs fonctions anti-tumorales dans un environnement riche en IL-5, comme c'est le cas dans les allergies. De plus, les études effectuées au sein du laboratoire montrent que les éosinophiles purifiés à partir des donneurs allergiques induisent une apoptose des cellules cancéreuses significativement plus importante que les éosinophiles issus de donneurs non-allergiques (250), suggérant un état de pré-activation des éosinophiles chez les sujets allergiques.

#### 2.4.2 Polymorphisme de l'ECP

En plus des processus impliquant les IgE ou l'IL-5, il doit être noté l'existence d'un polymorphisme génétique dans le gène de l'ECP, conduisant à la production de l'ECPArg97. La présence de cette ECP mutée est associée à l'apparition de symptômes allergiques (52) et la maladie de Hodgkin de type sclérose nodulaire (225). Ces corrélations entre les symptômes allergiques et la fibrose dans le lymphome sont en faveur d'une altération biologique de la fonction de l'ECP en fonction du génotype.

#### 2.4.3 Utilisation des IgE dans l'immunothérapie des cancers

L'hétérogénéité de cytotoxicité des éosinophiles observée chez les sujets allergiques et non allergiques pourrait également suggérer que la réponse au développement tumoral est plus efficace chez les sujets allergiques, avec un potentiel rôle de « senseur » des IgE (251). Comme écrit précédemment, les éosinophiles expriment aussi bien les récepteurs pour les IgE de faible et de forte affinité (FcεRI) (cf. § I.4.2. p11) et des IgE de surface ont pu être détectées sur les éosinophiles des donneurs allergiques (60). Ainsi, un mécanisme de toxicité cellulaire dépendant des anticorps via les IgE pourrait également être impliqué, comme cela se passe vis-à-vis des cibles parasitaires (65).



L'utilisation d'anticorps monoclonaux dans le traitement de cancers est de plus en plus fréquente. Actuellement, seuls les anticorps de la classe des IgG (en général des IgG1) sont utilisés. Cependant, les anticorps de la classe des IgE présentent plusieurs avantages. Tout d'abord l'affinité des IgE pour son récepteur de forte affinité, FcεRI, est de l'ordre de  $10^2$  à  $10^5$  fois plus importante que celle des IgG pour leurs récepteurs et leur demi-vie dans les tissus est d'environ deux semaines, contre deux à trois jours pour les IgG. En plus des éosinophiles, les monocytes/macrophages, les mastocytes et les cellules dendritiques expriment également le FcεRI. Il est intéressant de noter que les cellules effectrices des IgE sont des cellules à tropisme tissulaire, présentes en quantité importante au sein des tumeurs. Il faut également noter que, contrairement aux IgG, les IgE n'ont pas de récepteur inhibiteur et surtout qu'ils induisent des fonctions effectrices d'ADCC très puissantes.

La longue dissociation entre les IgE et le FcεRI ainsi que leur rétention tissulaire pourraient permettre l'utilisation de doses thérapeutiques plus faibles ou une diminution de la fréquence d'administration (254,255). Les anticorps monoclonaux de type IgE pourraient donc être des classes thérapeutiques très intéressantes dans l'immunothérapie du cancer.

Afin de tester cette hypothèse, deux anticorps monoclonaux de la classe des IgE ont été créés, le premier ciblant EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor), exprimé par des cellules de carcinome du côlon ou du naso-pharynx, le second ciblant l'HER2/neu, proto-oncogène surexprimé dans certains cancers du sein et du côlon. Ces deux anticorps ont montré leur efficacité *in vitro et in vivo*, supérieure à celle observée avec les anticorps correspondant de la classe des IgG, le cetuximab et le trastuzumab, ces deux anticorps monoclonaux étant les traitements de référence des cancers exprimant l'EGFR et l'HER2/neu respectivement (256,257).

Ainsi, les éosinophiles participent à concept d'Allergo-Oncologie par le fait que ces cellules soient, dans un contexte et environnement allergique, plus cytotoxique vis-à-vis des cibles tumorales, donnant un début d'explication aux études épidémiologiques reliant allergie et incidence de cancers, et qu'elles soient également les cellules effectrices privilégiées de l'ADCC médiée par les IgE.

## 2.5. Eosinophiles, IL-18 et cancer du côlon

Lors de cette introduction, nous avons pu voir que, les éosinophiles sont des cellules tissulaires immunorégulatrices et cytotoxiques, capables d'intégrer de nombreux signaux et d'y répondre sélectivement. Ces capacités en font donc des effecteurs potentiels dans l'immunité anti-tumorale et particulièrement dans le contexte du cancer côlon, puisque les éosinophiles sont retrouvés majoritairement au niveau du tractus gastro-intestinal.

De la même manière, l'IL-18 est une cytokine immunorégulatrice ayant un rôle particulièrement important dans l'homéostasie et les pathologies digestives. Son activité anti-tumorale a été caractérisée dans différents modèles *in vivo*, par sa capacité à activer les lymphocytes et cellules NK.

## OBJECTIFS DU TRAVAIL

Les éosinophiles ont longtemps été considérés comme de simples cellules effectrices ayant un rôle bénéfique dans l'immunité anti-infectieuse, notamment dans la défense vis-à-vis des infections à helminthes, et un rôle néfaste dans de nombreuses pathologies telles que l'allergie ou l'asthme. Aujourd'hui, et notamment grâce aux travaux effectués au sein du laboratoire du Pr. Monique Capron, les éosinophiles apparaissent comme des cellules multifonctionnelles, immuno-régulatrices, impliquées à la fois dans l'immunité innée et adaptative (29). Dans ce contexte, les études, menées dans le laboratoire, ont abouti à la découverte de nouveaux récepteurs et médiateurs, tels que le TCR $\gamma\delta$ , le TLR2 ou le granzyme A, plaçant les éosinophiles en première ligne dans la lutte contre certains pathogènes, comme les mycobactéries, ou dans l'immunité anti-tumorale (31,36,250). Cette thèse s'inscrit dans la continuité de ces travaux.

Si les études histologiques et épidémiologiques ont bien caractérisé la présence d'éosinophiles au niveau des tumeurs, les mécanismes moléculaires mis en jeu dans la relation éosinophiles/cellules tumorales restent à être déterminés. Après caractérisation de l'activité cytotoxique des éosinophiles humains vis-à-vis de cellules tumorales, et notamment vis-à-vis d'une lignée de carcinome de côlon, nous nous sommes focalisés sur l'effet de l'IL-18 puisque nombreux travaux suggèrent que cette cytokine est impliquée dans le maintien de l'intégrité de la barrière intestinale et la réponse anti-tumorale avec un rôle prépondérant du compartiment hématologique (187,188).

### **Partie I : Immunité anti-tumorale des éosinophiles humains**

Dans cette partie, nous avons cherché à caractériser l'immunité anti-tumorale des éosinophiles humains par une méthode *in vitro* de cytométrie en flux, basée sur un marquage Annexine V  $^{+/-}$  associé à un marquage par du iodure de propidium afin de différencier et quantifier l'apoptose et la nécrose des cellules tumorales. Les études épidémiologiques ont démontré une valeur pronostic différente des TATEs selon le contexte tumoral (94), nous avons donc tout d'abord validé notre modèle *in vitro* en étudiant l'effet cytotoxique des éosinophiles humains vis-à-vis de plusieurs lignées cellulaires choisies à partir des données épidémiologiques (carcinome du côlon, de la vessie, mélanome et maladie de Hodgkin). Au regard de nos résultats et de la thématique de notre unité Inserm, nous avons choisi de nous

focaliser sur l'étude de la cytotoxicité des éosinophiles vis-à-vis d'une lignée cellulaire humaine de carcinome du côlon, les Colo-205. Le contact entre ces deux types cellulaires est nécessaire pour l'induction de la mort des Colo-205 et implique l'intégrine LFA-1 (CD11a/CD18) sur les éosinophiles (250). Nous avons donc cherché à déterminer les mécanismes impliqués dans ce contact, par le phénotypage des Colo-205 pour les ligands de LFA-1 par cytométrie en flux, puis par leur implication dans la liaison entre Colo-205 et éosinophiles et dans la cytotoxicité de ces derniers.

## **Partie II : Activation des éosinophiles par l'IL-18**

Avant de déterminer l'action de l'IL-18 sur la cytotoxicité des éosinophiles, nous avons tout d'abord étudié l'effet d'une stimulation de cette cytokine sur ces cellules. Par cytométrie en flux, nous avons tout d'abord recherché la présence des deux chaînes du récepteur à l'IL-18, nécessaires à sa signalisation. La libération des médiateurs cytotoxiques classiques libérés par les éosinophiles, tels que les ROS et les protéines cationiques, a ensuite été étudiée par des techniques de chimiluminescence et ELISA. Enfin, l'IL-18 augmente la cytotoxicité des lymphocytes et cellules NK par la libération d'IFN $\gamma$  et par l'augmentation de l'expression de FasL (138,156). Ces deux molécules ont donc également été étudiées par ELISA et cytométrie en flux.

## **Partie III : IL-18 et cytotoxicité anti-tumorale des éosinophiles**

Les éosinophiles humains étant capables de répondre à une stimulation par l'IL-18, nous avons étudié, dans cette dernière partie, l'implication de cette cytokine dans le modèle *in vitro* de cytotoxicité des éosinophiles vis-à-vis des Colo-205 via l'utilisation d'inhibiteurs de cette cytokine. L'effet de l'IL-18 dans la cytotoxicité nécessitant un contact cellulaire (193), nous avons étudié son implication dans l'adhérence entre éosinophiles et Colo-205, également nécessaire à l'induction de la mort de ces dernières par les éosinophiles.

Ces travaux ont permis la rédaction d'un article, actuellement en reviewing favorable à Journal of Immunology (Annexe 2).

## MATERIELS ET METHODES

### Purification des éosinophiles à partir de sang veineux périphérique

Le sang veineux périphérique a été collecté, sur tube hépariné, auprès de donneurs normaux, donneurs allergiques et de donneurs souffrant d'un syndrome hyperéosinophilique après recueil de leur consentement éclairé (Clinical trials.gov identifier : NCT01713504). La purification des éosinophiles se fait ensuite en deux étapes :

- **Séparation des cellules polynucléées et des cellules mononucléées par gradient de densité.** Après une dilution v/v de 15 ml de sang dans du PBS (Invitrogen), 15 ml de Percoll (Pharmacia Biotech) de densité 1,082 g/l sont ajoutés lentement dans le fond d'un tube de 50 ml. Celui-ci est ensuite centrifugé à 700 x g pendant 20 minutes à 20°C. Afin de limiter la contamination par les cellules mononucléées (lymphocytes, monocytes), l'anneau de PBMC est délicatement retiré et le culot contenant les globules rouges et les cellules polynucléées est transféré dans un autre tube. Deux étapes successives de lyse sont ensuite réalisées pendant 15 minutes à 4°C à l'aide d'un tampon hypotonique (NH<sub>4</sub>Cl 15 mM ; NaHCO<sub>3</sub> 10 mM ; EDTA 0.1 mM ; pH 7,4). La numération des cellules (majoritairement des polynucléaires neutrophiles et éosinophiles) ainsi isolées est estimée par un compteur cellulaire (Countess<sup>TM</sup> Automated Cell counter ; Invitrogen). Leur pourcentage au sein de cette fraction est déterminé après cytocentrifugation sur lame et coloration au RAL 555 (May-Grundwald-Giemsa). Cela permettra d'estimer la quantité de billes magnétiques à utiliser.
- **Isolation des éosinophiles par sélection négative.** Les polynucléaires sont incubés dans du PBS-BSA-0,5% (Eurobio) avec des billes magnétiques anti-CD16 (Miltenyi Biotech) pendant 30 minutes à 4°C. Des billes magnétiques anti-CD2 et anti-CD14 (Miltenyi Biotech) sont utilisées pendant 15 minutes à 4°C pour éliminer les éventuels lymphocytes et monocytes contaminants. La suspension cellulaire est ensuite passée au travers d'une colonne CS (Miltenyi Biotech) placée entre deux aimants. Les cellules exprimant le CD16 (majoritairement les neutrophiles), le CD2 (lymphocytes) et le CD14 (monocytes) sont retenues dans la colonne et les éosinophiles sont récupérés dans l'éluat. Après centrifugation à 300 x g pendant 8 minutes à 4°C, les éosinophiles sont repris dans du PBS puis comptés par compteur cellulaire. La pureté, déterminée après cytocentrifugation et coloration au RAL, a toujours été supérieure à 98%.

### Lignées cellulaires

La lignée cellulaire Colo-205 (carcinome du colon humain) a été obtenue auprès de l'American Type Culture Collection (ATCC). La lignée T24 (carcinome de la vessie humain) et L428 (lymphome de Hodgkin) ont été obtenues auprès de la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellculturen (DSMZ). La lignée HBL (LOCE-MM001) a été aimablement fournie par le Pr. G. Ghanem (L.O.C.E., Bruxelles, Belgique).

Les cellules sont cultivées à 37°C avec 5% de CO<sub>2</sub> dans soit du RPMI 1640 ou du DMEM, supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal décomplémenté (SVF), 25mM de tampon HEPES, 2mM de L-glutamine, 10mM de pyruvate de sodium et 10µg/ml de gentamycine (Life Technologies).

### Tests de cytotoxicité

Pour les tests de cytotoxicité, les éosinophiles sont cultivés pendant une nuit à 37°C avec 5% de CO<sub>2</sub>, à la concentration de  $2 \times 10^6$  cellules/ml dans du milieu de culture complet (MC) (RPMI 1640 sans rouge de phénol, supplémenté) dans une plaque de culture 96 puits fond plat, soit 0.5M d'éosinophiles dans 250µl de MC.

Les cellules tumorales sont marquées avec un marqueur membranaire, le PKH-26 (Sigma-Aldrich), selon les recommandations du fabricant, afin de différencier par la suite les cellules tumorales des éosinophiles (Figure 16). Elles sont ensuite co-incubées avec les éosinophiles à différents ratios effecteurs/cible (E:T) (2 :1, 5 :1 ; 10 :1 et 25 :1) et différents temps (de 15 minutes à 6 heures).

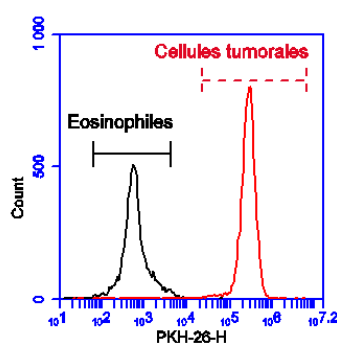


Figure 16 : Stratégie de gating des tests de cytotoxicité

La totalité des cellules est ensuite récupérée, par resuspension manuelle pour les Colo-205 (cellules semi-adhérentes) et L428 (cellules non adhérentes) ou après utilisation de 0.05%

trypsine/EDTA pour les HBL et T24 (cellules adhérentes) et transférée dans des tubes polypropylène de 5mL. Après lavage et centrifugation à 300g pendant 10 minutes, la cytotoxicité induite par les éosinophiles envers les lignées cellulaires marquées au PKH-26 a été mesurée après un marquage avec de l'annexine V-FITC (Miltenyi Biotech) pendant 15 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière selon les recommandations du fabricant. La distinction entre apoptose et nécrose a été réalisée en effectuant un marquage additionnel avec du iodure de propidium (Miltenyi Biotech). Les analyses ont été faites sur un cytomètre BD Accuri<sup>TM</sup> C6 (Becton Dickinson) et avec le logiciel BD CFlow Sampler. La mort spécifique (apoptose + nécrose) a été déterminée par la formule suivante :

$$\text{Mort cellulaire spécifique} = \% \text{ mort cellulaire expérimentale} - \% \text{ mort cellulaire spontanée}$$

Pour les tests d'inhibition, les éosinophiles et/ou les Colo-205 ont été pré-incubées, pendant 30 minutes, avec la protéine recombinante humaine IL-18 binding protein (IL-18BP) (R&D systems) ou avec des anticorps neutralisants monoclonaux : anti-IL-18 (clone 125-2H) (MBL), anti-ICAM-1 (clone BBIG-I1) (R&D systems), anti-JAM-A (clone 654806) (R&D systems), anti-ICAM-2 (clone CBRIC2/2) (eBioscience) et anti-ICAM-3 (CBR-IC3/1) (eBioscience). Les isotypes contrôles, mouse IgG2a pour l'anti-ICAM-2 (eBioscience) ou mouse IgG1 (R&D systems) pour les autres anticorps, ont été utilisés à la même concentration que les anticorps neutralisants (10µg/ml).

### Adhérence cellulaire

L'adhérence entre les éosinophiles et les Colo-205 a été réalisée par une technique de cytométrie en flux, comme décrite précédemment (250). Brièvement, les éosinophiles sont marqués au CFSE (Invitrogen) et les Colo-205 au PKH-26. Après 1.5 heure de co-incubation à 37°C, au ratio E:T de 5 :1, le pourcentage de Colo-205 liées aux éosinophiles est calculé selon la formule :

$$\% \text{ Colo-205 liées} = \text{nb de Colo-205 liées (cellules PKH-26}^+\text{CFSE}^+) / \text{nb total de Colo-205 (cellules PKH-26}^+) \times 100.$$

A l'inverse, le pourcentage d'éosinophiles liés aux Colo-205 est calculé de la façon suivante :

$$\% \text{ d'éosinophiles liés} = \text{cellules PKH26}^+\text{CFSE}^+ / \text{cellules CFSE}^+ \times 100.$$

Pour les tests d'inhibition, les éosinophiles et/ou les Colo-205 ont été pré-incubées, pendant 20 minutes, avec la protéine recombinante humaine IL-18 binding protein (IL-18BP)

(R&D systems) ou avec des anticorps neutralisants monoclonaux : anti-IL-18 (clone 125-2H) (MBL), anti-ICAM-1 (clone BBIG-I1) (R&D systems), anti-JAM-A (clone 654806) (R&D systems), anti-ICAM-2 (clone CBRIC2/2) (eBioscience) et anti-ICAM-3 (CBR-IC3/1) (eBioscience). Les isotypes contrôles, mouse IgG2a pour l'anti-ICAM-2 (eBioscience) ou mouse IgG1 (R&D systems) pour les autres anticorps, ont été utilisée à la même concentration que les anticorps neutralisants (10µg/ml).

### Cytométrie en flux

Les anticorps utilisés sont résumés dans le tableau 4.

Anticorps	Fluorochrome	Classe	Clone	Fournisseur
<b>ICAM-1</b>	FITC	Mouse IgG1	BBIG-I1	R&D Systems
<b>ICAM-2</b>	PE	Mouse IgG2a	CBR-IC2/2	Biolegend
<b>ICAM-3</b>	PE	Mouse IgG1	CBR-IC3/1	Biolegend
<b>JAM-A</b>	AF488	Mouse IgG1	654806	R&D Systems
<b>CD18</b>	FITC	Mouse IgG1	345913	R&D Systems
<b>CD11a</b>	FITC	Mouse IgG1	212701	R&D Systems
<b>IL-18</b>	NM	Mouse IgM	12E7.1	Millipore
<b>NLRP3</b>	NM	Mouse IgG1	652514	R&D Systems
<b>IL-18R<math>\alpha</math></b>	PE	Mouse IgG1	H44	eBioscience
<b>IL-18R<math>\beta</math></b>	FITC	Mouse IgG2b	132029	R&D Systems
<b>FasL</b>	PE	Mouse IgG1	NOK-1	Miltenyi Biotech
<b>Fas</b>	FITC	Mouse IgG1	DX2	Miltenyi Biotech

**Tableau 5 : Liste des anticorps utilisés pour la cytométrie en flux**

FITC : Isothiocyanate de fluorescéine ; PE : Phycoérythrine ; AF : AlexaFluor ; NM : non marqué

- Marquage membranaire

Les éosinophiles, utilisés à la concentration de  $4 \times 10^6$  cellules/ml, sont déposés dans une plaque 96 puits à fond rond (50 µl/puit). Ils sont gardés durant toute la durée du marquage dans du PBS-BSA 1% (tampon membranaire) à la température de 4°C.

Dans le cas d'un marquage direct, après une étape de blocage afin d'éviter tout marquage, aspécifique, avec du sérum de souris (Sigma), les cellules sont ensuite incubées 20 minutes avec l'anticorps conjugué au fluorochrome à l'abri de la lumière. Lors d'un marquage indirect, l'anticorps primaire non marqué est tout d'abord incubé avec les éosinophiles pendant 20 minutes. Après lavage, 5µl de sérum, de l'espèce dans laquelle l'anticorps



secondaire a été produit, est ajouté pendant 10 minutes, puis l'anticorps secondaire est incubé 20 minutes.

Après un lavage, les cellules sont suspendues dans du PBS puis analysées par cytométrie en flux. L'acquisition est effectuée sur le cytomètre BD Accuri<sup>TM</sup> C6 et analyse se fait sur le logiciel BD CFlow Sampler. La médiane de l'intensité de fluorescence est calculée selon la formule :

$$\%MFI = [(median\ Ab\ signal - median\ isotype\ control\ signal) / median\ isotype\ control\ signal] \times 100.$$

- Marquage intracellulaire

Les éosinophiles sont tout d'abord fixés avec du paraformaldéhyde 2% (Thermo Scientific) pendant 10 minutes. Après un lavage au PBS, les cellules sont perméabilisées avec du tampon intracellulaire (PBS-BSA 1%-Saponine 0,1% (Sigma)) pendant 10 minutes.

Les marquages directs et indirects sont réalisés de la même manière que décrit précédemment, mais à température ambiante et dans le tampon IC.

#### RT-PCR quantitative

L'expression de l'ARNm de l'IL-18 a été évaluée pour les éosinophiles, les Colo-205 seules et chez ces populations cellulaires cultivées ensemble. Dans le cas des co-cultures, les Colo-205 ont été plaquées et cultivées pendant une nuit dans des plaques de culture 6 puits. Le milieu de culture a ensuite été remplacé et  $1.5 \times 10^6$ /ml d'éosinophiles humains ont été ajoutés. Après 3 heures à 37°C, les éosinophiles ont été récupérés en rinçant les plaques avec du PBS. Ensuite, les Colo-205 ont été décollées avec 0.05% trypsine EDTA. La pureté de chaque fraction a été déterminée par un marquage CD11a-FITC en cytométrie en flux. Celles-ci ont été estimées supérieures à 95% pour les éosinophiles et à 85% pour les Colo-205.

L'ARN total des éosinophiles et des Colo-205 a été isolé par du Trizol (Invitrogen / Life technologies), selon les recommandations du fabricant. 1µg d'ARN a été retro-transcrit en ADNc avec le kit 'high capacity cDNA reverse transcription kit' (Applied Biosystems / Life Technologies). La PCR quantitative en temps-réel a été faite sur un ABI StepOnePlus (Applied Biosystems) avec le fast SYBR<sup>®</sup> Green PCR master mix (Applied Biosystems). Les séquences des primers utilisées (Sigma-Aldrich) sont résumées dans le tableau 5.

Les valeurs du cycle seuil (Threshold cycle (Ct)) des gènes cibles ont été normalisées avec celle de la  $\beta$ -actine. Pour les données avec les co-cultures, le changement relatif dans l'expression des gènes a été analysé avec la méthode du  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ .

Gène	Type	Séquence (5'-3')
<b>IL-18</b>	Sens	CCAAGGAAATCGGCCTCTAT
	Antisens	TTGTTCTCACAGGAGAGAGTTGA
<b>NLRP3</b>	Sens	CCACTGTGATATGCCAGGAA
	Antisens	GGGTCAAACAGCAACTCCAT
<b>Caspase-1</b>	Sens	TTCCGCAAGGTTCGATTTTCA
	Antisens	GGCATCTGCGCTCTACCATC
<b>ASC</b>	Sens	TGGTCAGCTTCTACCTGGAG
	Antisens	CTGGTACTGCTCATCCGTCA
<b>B-actine</b>	Sens	GGGTCAGAAGGATTCCTATG
	Antisens	GGTCTCAAACATGATCTGGG

Tableau 6 : Séquences des primers

#### Dosage des protéines cationiques ECP et EDN

Après 18h d'incubation en milieu de culture en présence ou non d'agent stimulateur, la plaque est centrifugée et les surnageants sont récupérés. L'ECP et l'EDN sont mesurées dans les surnageants par méthode ELISA (Medical & Biological Laboratories) selon les recommandations du fabricant. Les sensibilités des kits sont respectivement 0,125ng/ml et 0,62ng/ml.

#### Dosage d'IFN $\gamma$

Après 18h d'incubation en milieu de culture, en présence ou non d'IL-18 (Medical & Biological Laboratories) et/ou d'IL-12 (Miltenyi Biotech) recombinantes, la plaque est centrifugée et les surnageants sont récupérés. L'IFN $\gamma$  est mesuré dans les surnageants par méthode ELISA (R&D systems) selon les recommandations du fabriquant. La sensibilité du kit est de 15.6 pg/ml.

### Dosages des espèces réactives de l'oxygène

Le dosage des espèces réactives de l'oxygène, libérés par les éosinophiles, est réalisé par une technique de chimioluminescence dépendante du luminol. Les éosinophiles sont suspendus dans du RPMI 1640 sans rouge phénol à la concentration de  $12 \times 10^6$  cellules/ml. 0,3M cellules sont déposées par puits dans une plaque blanche 96 puits. Juste avant de commencer la mesure de la chimioluminescence, 25  $\mu$ l de chaque stimulus sont ajoutés et 50  $\mu$ l de solution de luminol sont injectés (luminol 0,015 mg/ml, Tris-HCl 15 mM, NaCl 150 mM). L'excitation du luminol par les radicaux libres produits par les éosinophiles est mesurée instantanément. Les mesures sont effectuées sur un Fluorostar (BMG Labtech) et l'analyse s'effectue à l'aide du logiciel Mars (BMG Labtech). La cinétique est réalisée à 37°C sur une durée d'une heure. La chimioluminescence est comptée sur trois secondes. Les résultats sont exprimés en coups par seconde (cps).

### Analyse statistique

Tous les résultats sont exprimés par la moyenne  $\pm$  SEM. Les analyses statistiques ont été effectuées avec le logiciel SPSS. Les tests non paramétriques de Wilcoxon ou Mann-Whitney ont été utilisés pour la comparaison entre les différents groupes. Les différences sont considérées significatives lorsque la valeur p est inférieure à 0.05. Dans les figures, les symboles suivants sont utilisés: \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ; NS : non significatif.

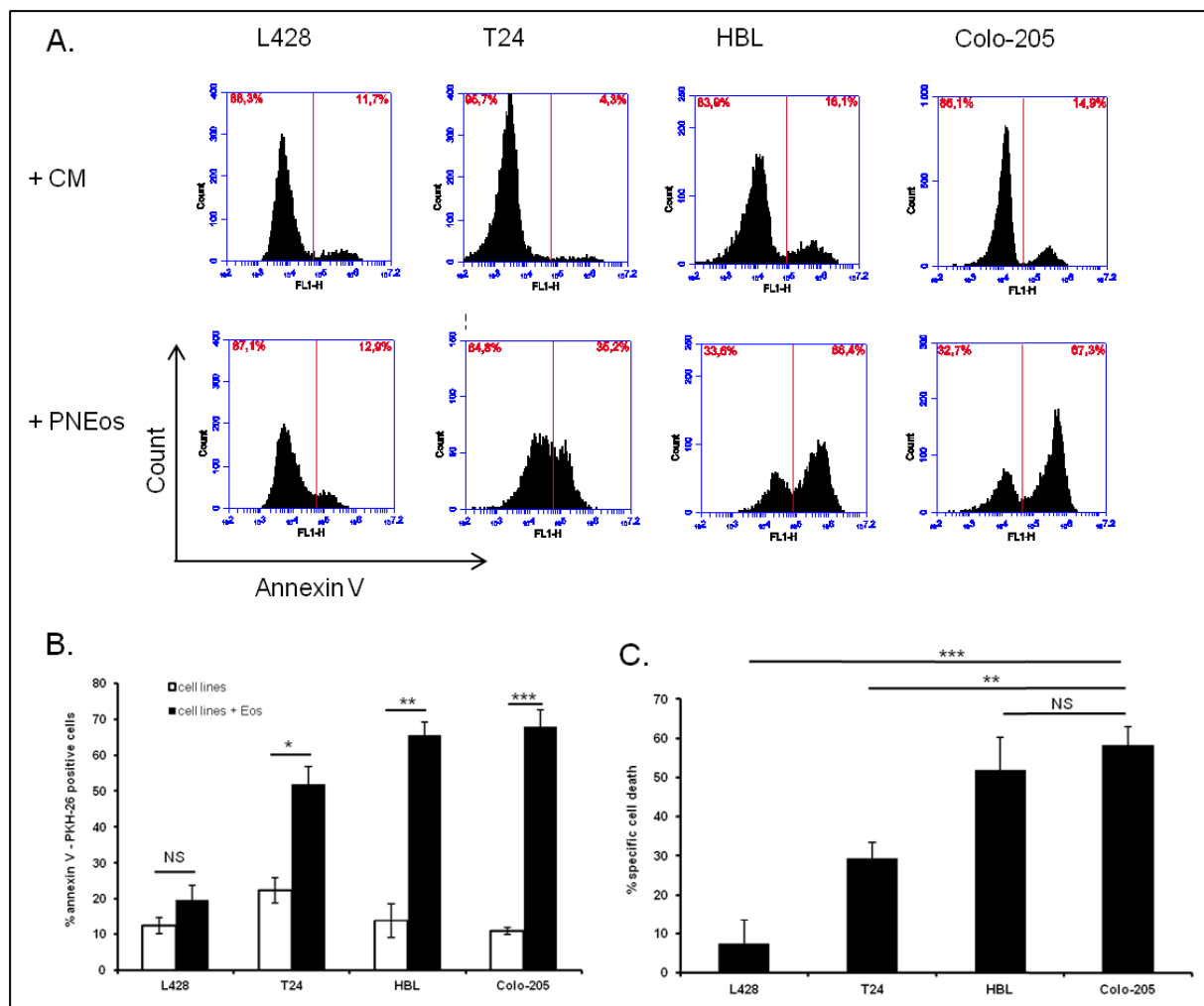
# RESULTATS

## **I. Partie I : Caractérisation de la cytotoxicité anti-tumorale des éosinophiles humains**

Nous avons vu dans la troisième partie de l'introduction (p.41) qu'il existe de plus en plus d'arguments, issus d'études épidémiologiques, *in vivo* ou *in vitro*, en faveur d'une participation des éosinophiles dans l'immunité anti-tumorale, en particulier dans le cancer du côlon (36,94,239,250), cependant les mécanismes moléculaires impliqués dans cette activité restent à être déterminés. Les éosinophiles sont notamment impliqués dans les processus de cytotoxicité par un mécanisme nécessitant une adhérence impliquant LFA-1 à la surface des éosinophiles (250). Dans cette première partie, nous avons cherché à étudier l'activité cytotoxique des éosinophiles humains vis-à-vis de plusieurs cellules tumorales et, en particulier, vis-à-vis d'une lignée de carcinome du côlon, les Colo-205.

### **1. Variation de la cytotoxicité des éosinophiles humaines selon la cible tumorale**

Comme présenté dans le paragraphe introductif III.2.1 (p.41), des études épidémiologiques ont reporté le fait qu'il existe des relations distinctes entre éosinophilie et différents types de tumeurs. En effet, celle-ci est associée, en générale, à un pronostic favorable, notamment dans les tumeurs du tube digestif, mais peut également être considérée comme un marqueur pronostique défavorable, par exemple comme dans le cas de la maladie de Hodgkin (94). Dans un premier temps, nous avons donc comparé, par cytométrie en flux, l'activité cytotoxique des éosinophiles humains vis-à-vis de plusieurs lignées cellulaires cancéreuses humaines, choisie selon le facteur pronostique bénéfique ou délétère de la présence d'une TATE. Pour cela, nous avons utilisé les L428 (lymphome de Hodgkin), les T24 (carcinome de la vessie), les HBL (mélanome) et les Colo-205 (carcinome du côlon) par une technique de cytotoxicité exposée précédemment (cf M&M p.59).



**Figure 17 : Différence fonctionnelle des éosinophiles humains selon la cible tumorale.**

Les cellules tumorales sont marquées avec du PKH-26, puis cultivées en absence ou en présence des éosinophiles à un ratio de 25/1 pendant 3 heures. (A) Histogrammes de cytométrie en flux représentatifs de l'apoptose de chaque lignée cellulaire, en absence (+CM) ou en présence (+PNEos) des éosinophiles issus d'un même donneur allergique. (B) Les barres blanches indiquent la mort spontanée des cellules et les barres noires montrent la mort cellulaire après incubation avec les éosinophiles. L428 (n=5), T24 (n=9), HBL (n=5) et Colo-205 (n=16) (C) Comparaison de la mort cellulaire spécifique entre les différentes lignées. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM. Le test de Wilcoxon a été utilisé pour la figure (B) et le test de Mann-Whitney a été utilisé pour la figure (C). \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ; NS : non significatif. (n : nombre d'expériences indépendantes)

Après marquage au PKH-26, les cellules tumorales sont incubées seules ou avec des éosinophiles humains purifiés à partir de donneurs normaux, allergiques ou atteints d'un SHE. Le taux d'apoptose basal de ces cellules tumorales après 3h d'incubation reste faible et identique selon les différentes lignées, de l'ordre de 10% (Fig. 17A-B). Lorsque les éosinophiles sont ajoutés aux cellules T24, HBL et Colo-205, le taux d'apoptose de ces cellules est significativement augmenté comparé à la mort spontanée de ces cellules (Fig. 17A-17B). En effet, le taux d'apoptose des T24 augmente de  $29.5 \pm 3.9\%$ , celui des HBL

augmente de  $51.8 \pm 8.3\%$  et celui des Colo-205 augmente de  $58.1 \pm 4.7\%$ . A l'inverse, aucun changement n'a été observé pour les cellules L428.

Il est également intéressant de noter que cette cytotoxicité est plus ou moins importante selon les lignées. L'apoptose induite par les éosinophiles la plus élevée, est observée pour les Colo-205 (Fig.17C). Cette constatation est notamment appuyée par l'observation faite pour la cytotoxicité des éosinophiles, purifiés à partir d'un même donneur allergique, selon les cibles tumorales (Fig.17A). Chez ce donneur, pour un même temps d'incubation, les éosinophiles n'induisent pas d'apoptose des L428, alors qu'ils entraînent la mort cellulaire de 30% des T24, de 50% des HBL et de 52% des Colo-205.

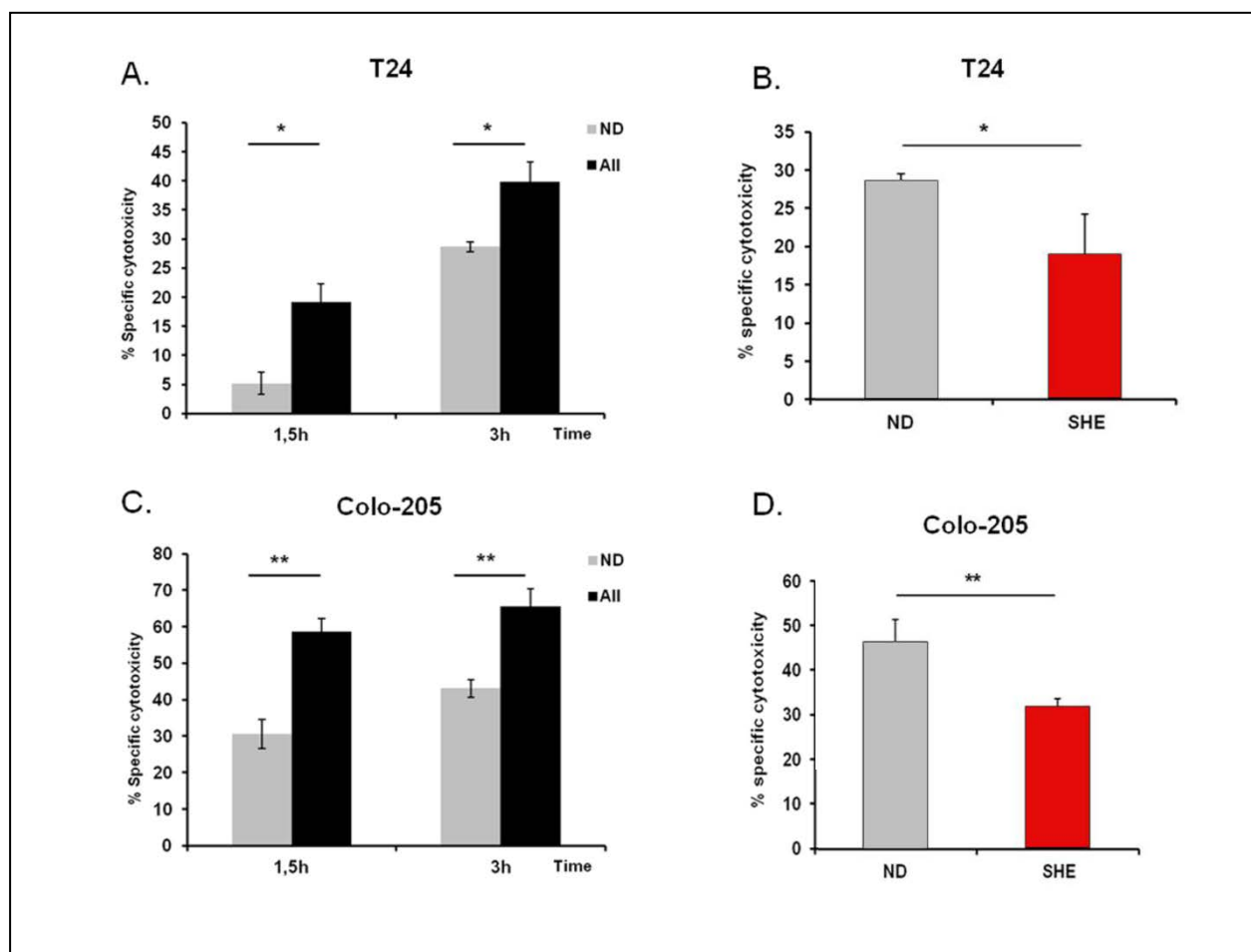
**Ces résultats suggèrent donc que la fonction tumoricide des éosinophiles est cible spécifique, et, en accord avec les différentes données épidémiologiques, que notre modèle *in vitro* est relevant.**

## **2. Variation de la cytotoxicité des éosinophiles selon le statut du donneurs**

Lors de cette étude, nous avons pu obtenir les éosinophiles auprès de différents types de donneurs. Ainsi, les éosinophiles ont été purifiés à partir de donneurs allergiques (allergie cutanée, respiratoire, alimentaire ou médicamenteuse), de donneurs atteints d'un Syndrome HyperEosinophile (SHE) (lymphoïde, myéloïde ou idiopathique) et de donneurs normaux. Le phénotype membranaire des éosinophiles varie selon l'état de maturation, d'activation mais également selon les statuts des donneurs (17,258), nous avons donc évalué si la cytotoxicité des éosinophiles varie selon les donneurs.

Après 1.5h ou 3h de co-incubation, les éosinophiles purifiés auprès de donneurs allergiques induisent significativement plus d'apoptose chez les T24 et les Colo-205 que les donneurs normaux (Fig. 18A, 18C). A l'inverse, les éosinophiles purifiés à partir de donneurs SHE sont significativement moins cytotoxiques vis-à-vis des T24 et Colo-205 que les donneurs normaux après 3h de co-incubation (Fig. 18B, 18D). Les éosinophiles purifiés auprès des sujets allergiques sont donc plus cytotoxiques vis-à-vis des cellules tumorales que les éosinophiles obtenus auprès de donneurs normaux, eux-mêmes plus cytotoxiques que les éosinophiles présents chez les patients atteints d'un SHE.

Ces résultats suggèrent donc l'activité cytotoxique anti-tumorale des éosinophiles humains est également dépendante du statut clinique des donneurs.



**Figure 18 : Différence fonctionnelle des éosinophiles selon le statut des donneurs**

La cytotoxicité spécifique des éosinophiles selon les donneurs a été étudiée pour les T24 et les Colo-205. Comparaison de l'apoptose des T24 par des éosinophiles issus de donneurs normaux (ND) (n=3) et allergiques (All) (n=3) après 1.5h et 3h de co-incubation (A) ou atteints d'un Syndrome HyperEosinophilique (SHE) (n=3) après 3h de co-incubation (B). Comparaison de l'apoptose des Colo-205 par des éosinophiles issus de donneurs normaux (ND) (n=6) et allergiques (All) (n=6) après 1.5h et 3h de co-incubation (C) ou atteints d'un Syndrome HyperEosinophilique (SHE) (n=4) après 3h de co-incubation (D). Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM. Le test de Mann-Whitney a été utilisé. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ; NS : non significatif. (n : nombre d'expériences indépendantes)

### 3. La cytotoxicité vis-à-vis des Colo-205 est temps et concentration-dépendante

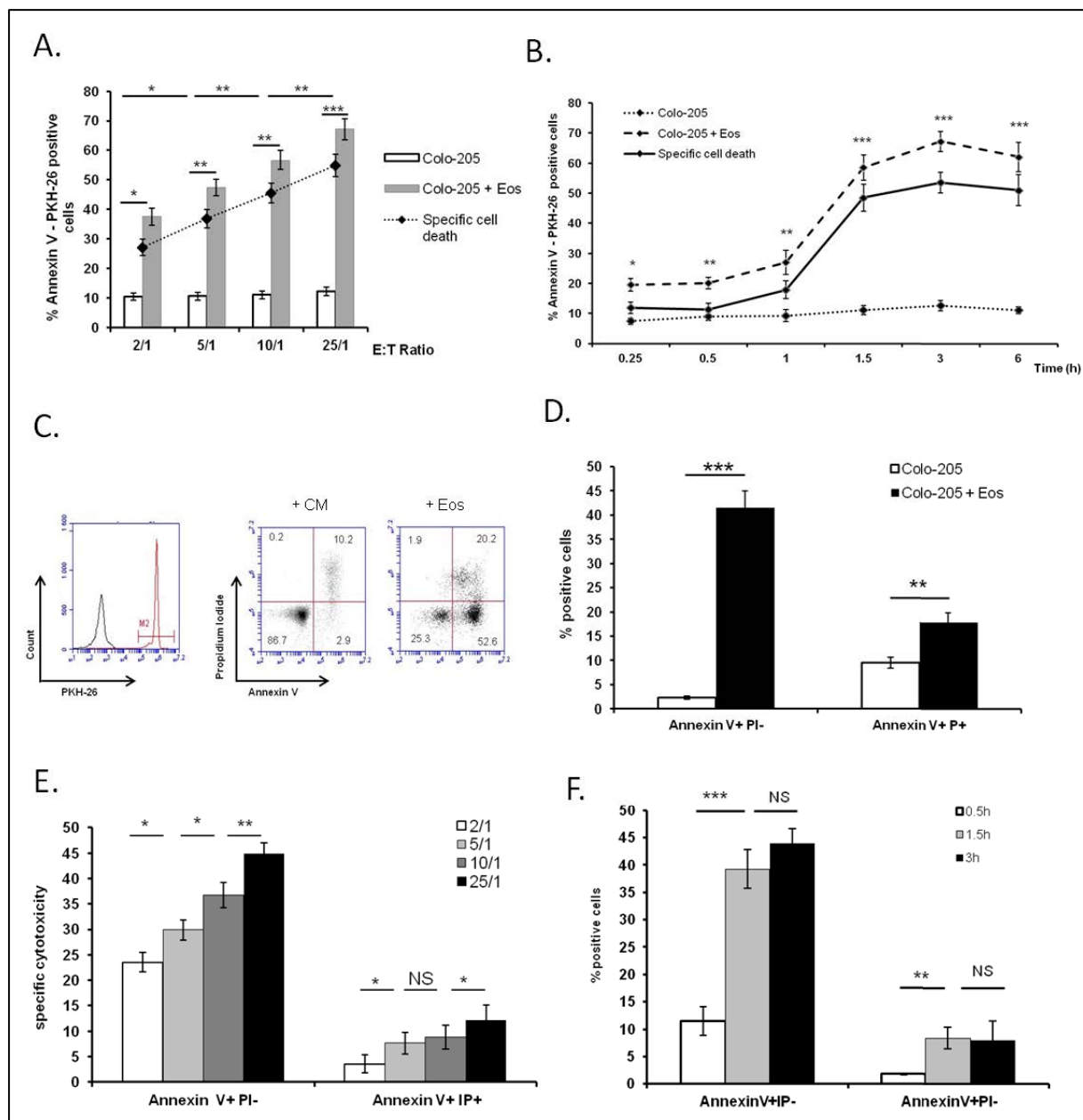
En accord avec les différentes données épidémiologiques, qui montrent que la présence d'une TATE est associée à un bon pronostic dans le cancer du côlon, et nos résultats,

montrant que les Colo-205 sont les cellules pour lesquelles les éosinophiles humains exercent la cytotoxicité la plus élevée (Fig. 17C), nous avons décidé de focaliser notre étude sur cette lignée cellulaire.

Afin de mieux caractériser l'effet des éosinophiles sur les Colo-205, nous avons tout d'abord incubé ces deux types cellulaires à différents ratios E:T, allant de 2:1 à 25:1. Nous avons observé que les éosinophiles sont cytotoxiques vis-à-vis des Colo-205 à tous les ratios E:T testés. En effet, à un ratio de 2:1, les éosinophiles induisent  $27.1 \pm 2.7\%$  de mort cellulaire des Colo-205. Cette cytotoxicité augmente jusqu'à un ratio de 25:1 pour lequel la mort des Colo-205 est évaluée à  $54.9 \pm 3.8\%$  (Fig. 19A). De la même manière, nous avons étudié l'effet du temps sur l'effet cytotoxique des éosinophiles. A un ratio de 25 :1, l'action des éosinophiles vis-à-vis des Colo-205 est très rapide, puisqu'une cytotoxicité spécifique significative est observée dès 15min de co-incubation. Celle-ci augmente modérément jusqu'à 1 heure d'incubation. Entre 1h et 1.5h, une forte augmentation de la mort cellulaire est observée, passant de 15% à environ 50%. La cytotoxicité des éosinophiles reste ensuite constante avec le temps, un phénomène de plateau étant observé entre 1.5h et 6 heures de co-incubation (Fig. 19B).

La cytotoxicité cellulaire peut être déclenchée par différents mécanismes moléculaire entraînant soit l'apoptose, soit la nécrose de la cellule cible. Nous avons donc, dans un second temps, déterminé la capacité des éosinophiles à induire ces deux types de mort cellulaire vis-à-vis des Colo-205. Cette mesure s'est également faite en cytométrie en flux par un marquage Annexine V, pour l'apoptose, et iodure de propidium pour la nécrose. Les taux d'apoptose et de nécrose des colo-205, préalablement marquées par du PKH-26, observés en présence d'éosinophiles ont été comparés aux taux spontanés déterminés après incubation en absence d'éosinophiles (Fig. 19C). Les éosinophiles induisent l'apoptose (de l'ordre de 40%) et, dans une moindre mesure, la nécrose (de l'ordre de 10%) des Colo-205 après 3h de co-incubation à un ratio E:T de 25:1 (Fig. 19D), suggérant l'implication de différents mécanismes dans la cytotoxicité des éosinophiles.





**Figure 19 : Temps- et concentration-dépendance de la cytotoxicité des éosinophiles vis-à-vis des Colo-205.**

Les Colo-205 sont cultivées soit seules (barres blanches) soit avec des éosinophiles (barres grises) à différents E:T ratios. La ligne en pointillée représente la cytotoxicité spécifique (n=6-11). (B) Les Colo-205 et les éosinophiles sont incubés, à un ratio de 25:1 pendant 0.25 à 6 heures. Le taux d'apoptose (traits interrompus), la mort spontanée (ligné en pointillée) et la cytotoxicité spécifique (ligne continue) sont représentés (n=7-21). (C) Dot plots représentatifs de 13 expériences indépendantes de cytométrie en flux. A gauche, les Colo-205 sont marquées au PKH-26 (en rouge) pour les différencier des éosinophiles (en noir). A droite, la mort cellulaire des Colo-205 est analysée en ciblant la population M2. Les cellules apoptotiques (Annexin V<sup>+</sup> IP<sup>+</sup>) sont différenciées des cellules nécrotiques (Annexin V<sup>+</sup> IP<sup>+</sup>) en absence (+CM) ou en présence des éosinophiles (+Eos). (D) Les taux d'apoptose (Annexin V<sup>+</sup> IP<sup>+</sup>) et de nécrose (Annexin V<sup>+</sup> IP<sup>+</sup>) sont mesurés à un ratio de 25:1 après 3 heures de co-culture. (E) Comparaison de l'apoptose et de la nécrose selon différents E:T ratios. (F) Comparaison de l'apoptose à différents temps d'incubation. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM. Le test de Wilcoxon a été utilisé. \* p < 0.05; \*\* p < 0.01; \*\*\* p < 0.001; NS : non significatif (n : nombre d'expériences indépendantes)

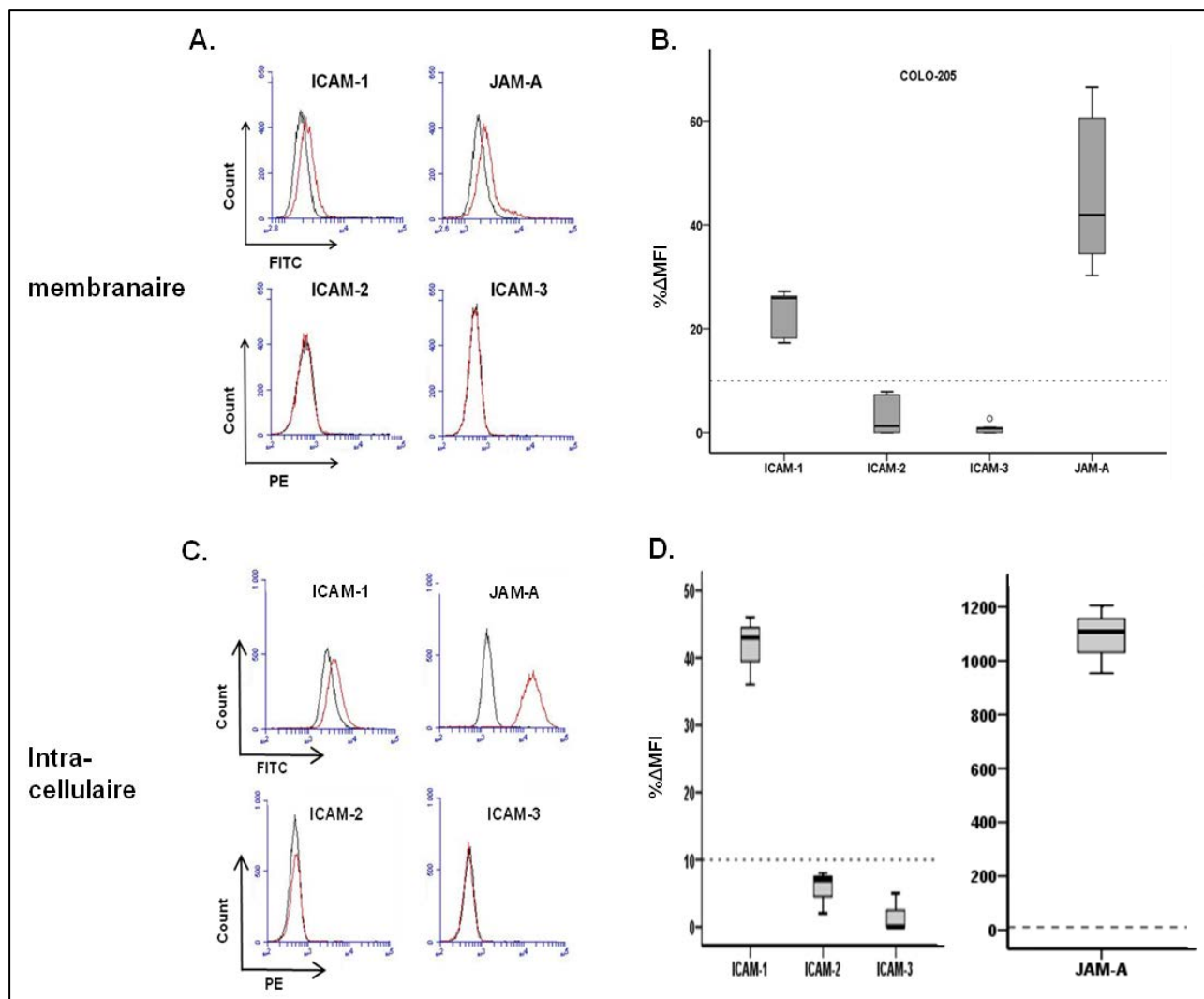
Il est intéressant de noter que les taux d'apoptose et nécrose augmentent avec le nombre d'éosinophiles (Fig. 19E) et avec le temps de co-incubation (Fig. 19F) et que le rapport entre apoptose et nécrose reste constant quel que soit le ratio E:T ou le temps d'incubation étudié.

**Ces résultats suggèrent que les éosinophiles sont capables d'induire l'apoptose et la nécrose des Colo-205 et que cette cytotoxicité est dépendante de la concentration en éosinophiles et du temps.**

#### **4. ICAM-1 et JAM-A sont nécessaires au contact entre les Colo-205 et les éosinophiles**

L'apoptose est donc le mécanisme prépondérant par laquelle les éosinophiles induisent la mort cellulaire des Colo-205. Fréquemment, l'induction de l'apoptose se fait par un contact direct entre cellule cible et cellule effectrice. De plus, une étude précédente, issue de notre laboratoire, a montré que la cytotoxicité des éosinophiles envers les Colo-205 est un mécanisme dépendant de l'adhérence entre ces deux types cellulaires (250). Cette étude a notamment mis en évidence l'implication de LFA-1 (CD11a/CD18) sur les éosinophiles (250). Cependant, la nature des ligands exprimés par les Colo-205 n'est actuellement pas connue.

Il existe plusieurs ligands pour l'intégrine LFA-1. Leur présence sur les Colo-205 n'a, à notre connaissance, pas encore été évaluée. Nous avons donc, tout d'abord, effectué un phénotypage de ces cellules pour ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3 et JAM-A, molécules d'adhérence capables de se lier au LFA-1 (259,260). Les Colo-205 expriment, au niveau membranaire (Fig. 20A, 20B) ICAM-1 et JAM-A. Cette expression est également retrouvée, en proportion plus importante, notamment pour le JAM-A, en intracellulaire (Fig. 20C, 20D). A l'inverse, nous n'avons pas pu mettre en évidence la présence d'ICAM-2 et d'ICAM-3 sur ces cellules.



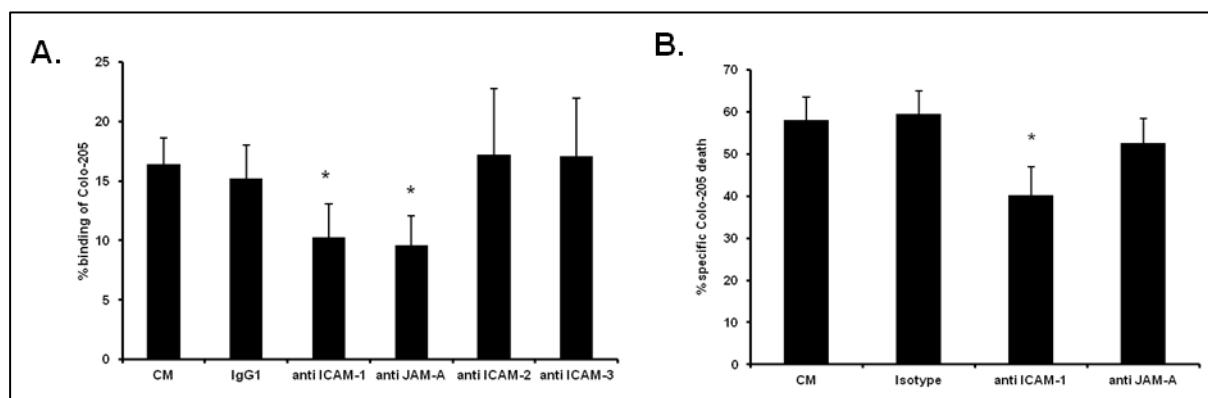
**Figure 20 : Expression de ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3 et JAM-A au sur les Colo-205.**

(A) Histogrammes représentatifs de cinq expériences indépendantes de cytométrie en flux montrant l'expression d'ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3 et JAM-A à la membrane des Colo-205. La détection des anticorps est indiquée par la ligne rouge et la détection de l'isotype contrôle correspondant est indiquée en noir. (B) Les boîtes à moustache représentent les pourcentages de variations de la médiane de l'intensité de fluorescence (%MFI) pour les molécules d'adhésion à la surface des colo-205 (n=5). Le seuil de significativité est représenté par la ligné en pointillée. (C-D) Expression intracellulaire des molécules d'adhérence.

Pour confirmer que ces molécules d'adhérence participent bien au contact entre éosinophiles et Colo-205, nous avons ajouté des anticorps neutralisants dans nos co-cultures puis mesuré le pourcentage de Colo-205 liées aux éosinophiles par une technique de cytométrie en flux (cf M&M p.60). Comme attendu, une diminution significative de l'adhérence entre éosinophiles et Colo-205 est observée lorsque les cellules tumorales sont pré-incubées avec des anticorps anti-ICAM-1 et anti-JAM-A (Fig. 21A) alors l'utilisation des anticorps anti-ICAM-2 et anti-ICAM-3 ne semble pas faire varier le taux de liaison entre ces cellules.

Afin d'évaluer l'implication de ces deux molécules dans le contact cellulaire aboutissant à l'apoptose des Colo-205, nous avons également utilisé les anticorps neutralisants dans le modèle de cytotoxicité. De façon surprenante, seule l'utilisation de l'anticorps anti-ICAM-1 induit également une diminution de l'apoptose des Colo-205 induite par les éosinophiles alors que l'anticorps anti-JAM-A ne semble pas avoir d'effet (Fig. 21B). De plus, l'ajout des deux anticorps neutralisants n'induit ni effet additif, ni effet synergique.

**Ces résultats suggèrent que, bien qu'ICAM-1 et JAM-A soient exprimés par les Colo-205, le rôle d'ICAM-1 semble prédominant pour la cytotoxicité des éosinophiles.**



**Figure 21 : Implication d'ICAM-1 et de JAM-A dans l'adhérence et la cytotoxicité des éosinophiles**

(A) Effets des anticorps neutralisants ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3 et JAM-A, utilisés à 10µg/ml, sur l'adhérence des Colo-205 aux éosinophiles après 1.5h de co-incubation à un ratio de 5:1 (n=6). (D) Inhibition de la mort cellulaire des Colo-205 induite par les éosinophiles par les anticorps neutralisants anti-ICAM-1 et anti-JAM-A (n=6). CM : milieu de culture ; Isotype : anticorps IgG contrôle. Les résultats sont exprimés par la moyenne  $\pm$  SEM. Le test de Wilcoxon a été utilisé.\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ . (n : nombre d'expériences indépendantes)

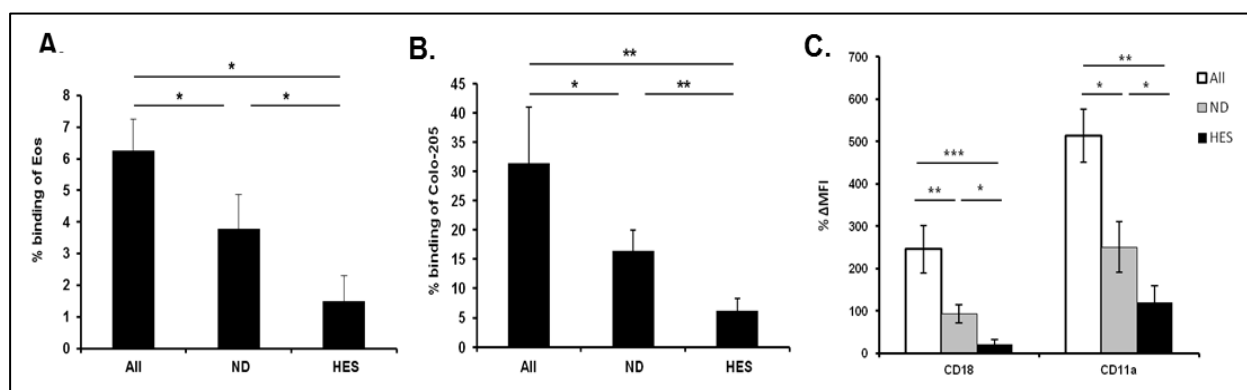
## 5. Adhérence et hétérogénéité fonctionnelle des éosinophiles

Nous avons observé précédemment qu'il existe une véritable différence fonctionnelle des éosinophiles selon le statut des donneurs auprès desquels ils ont été purifiés. Nous avons étudié l'adhérence entre les éosinophiles et les Colo-205 en s'intéressant au statut des donneurs.

Les éosinophiles purifiés à partir des donneurs allergiques sont significativement plus capables de se lier aux Colo-205 que les éosinophiles issus de donneurs normaux (Fig.22A, 22B). A contrario, les éosinophiles de donneurs SHE entrent significativement moins en

contact avec les colo-205 que les éosinophiles des autres groupes de sujets (Fig. 22A, 22B). Ces résultats sont à mettre en relation avec le fait qu'il existe également une hétérogénéité phénotypique des éosinophiles pour l'intégrine LFA-1 selon le type de donneurs. En accord avec nos données, les éosinophiles de sujets allergiques expriment, au niveau membranaire, plus les CD18 et CD11a que les éosinophiles des donneurs normaux, eux-mêmes en ont plus que les éosinophiles de patients SHE.

**Ces résultats suggèrent une différence de capacité de liaison aux Colo-205 ainsi qu'une hétérogénéité phénotypique pour l'expression de LFA-1 des éosinophiles selon les différents donneurs.**



**Figure 22 : Rôle de l'adhérence dans l'hétérogénéité fonctionnelle des éosinophiles**

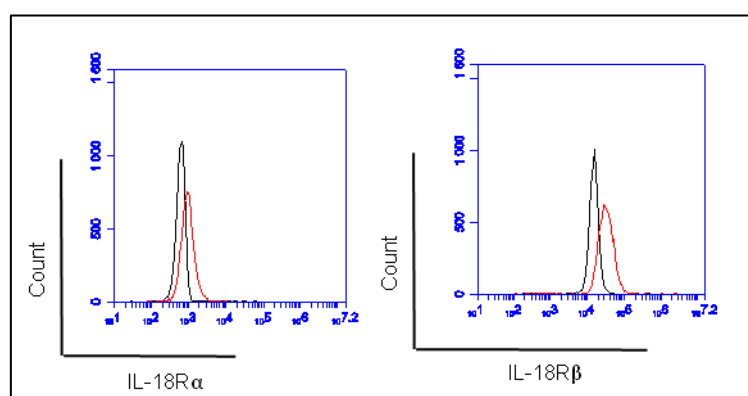
(A, B) Histogrammes représentant l'adhérence des éosinophiles (A) et des Colo-205 (B) selon le statut des donneurs. (All : n=5 ; ND : n=4 ; HES : n=5). (C) Expression par cytométrie en flux de CD18 et CD11a (LFA-1) à la membrane des éosinophiles selon le statut du donneurs (n= 6-9). Les résultats sont représentés par les moyennes  $\pm$  SEM. Le test de Mann-Whitney a été utilisé. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ . (n : nombre d'expériences indépendantes)

## II. Partie II : Activation des éosinophiles par l'IL-18

Dans cette étude de cytotoxicité des éosinophiles vis-à-vis des Colo-205, il nous a semblé pertinent de nous intéresser particulièrement à l'IL-18 puisque, celle-ci a, comme les éosinophiles, une fonction importante dans l'homéostasie et les pathologies digestives, notamment dans la réponse anti-tumorale (163,164). Cependant, l'action de cette cytokine sur les éosinophiles n'a été que très peu étudiée, nous avons donc, dans un premier temps, évalué la capacité de l'IL-18 à activer les éosinophiles.

### 1. Les éosinophiles humains expriment l'IL-18R

Le récepteur de l'IL-18 est un hétérodimère composé d'une chaîne se liant à l'IL-18, l'IL-18R $\alpha$  et d'un récepteur accessoire, l'IL-18R $\beta$  (126). Ce dernier est nécessaire à la signalisation qui suit la liaison de l'IL-18 à l'IL-18R $\alpha$ . Une étude a mis en évidence la présence de l'IL-18R $\alpha$  à la membrane des éosinophiles. Cependant, ils n'ont pas recherché la présence de l'IL-18R $\beta$ , supposant qu'il était présent puisque les éosinophiles étaient capables de répondre à l'IL-18 (161). Nous avons tout de même voulu confirmer la présence des deux chaînes de récepteur à la membrane des éosinophiles, par cytométrie en flux. Comme attendu, ces cellules expriment la totalité de ce récepteur (Fig. 23).



**Figure 23 : Présence de l'IL-18R à la membrane des éosinophiles**

Dot plots représentatifs de 7 expériences indépendantes. La présence de l'IL-18R $\alpha$  et de l'IL-18R $\beta$  à la surface des éosinophiles est évaluée par cytométrie en flux. Le marquage par l'anticorps est représenté en rouge, l'isotype contrôle est représenté en noir.

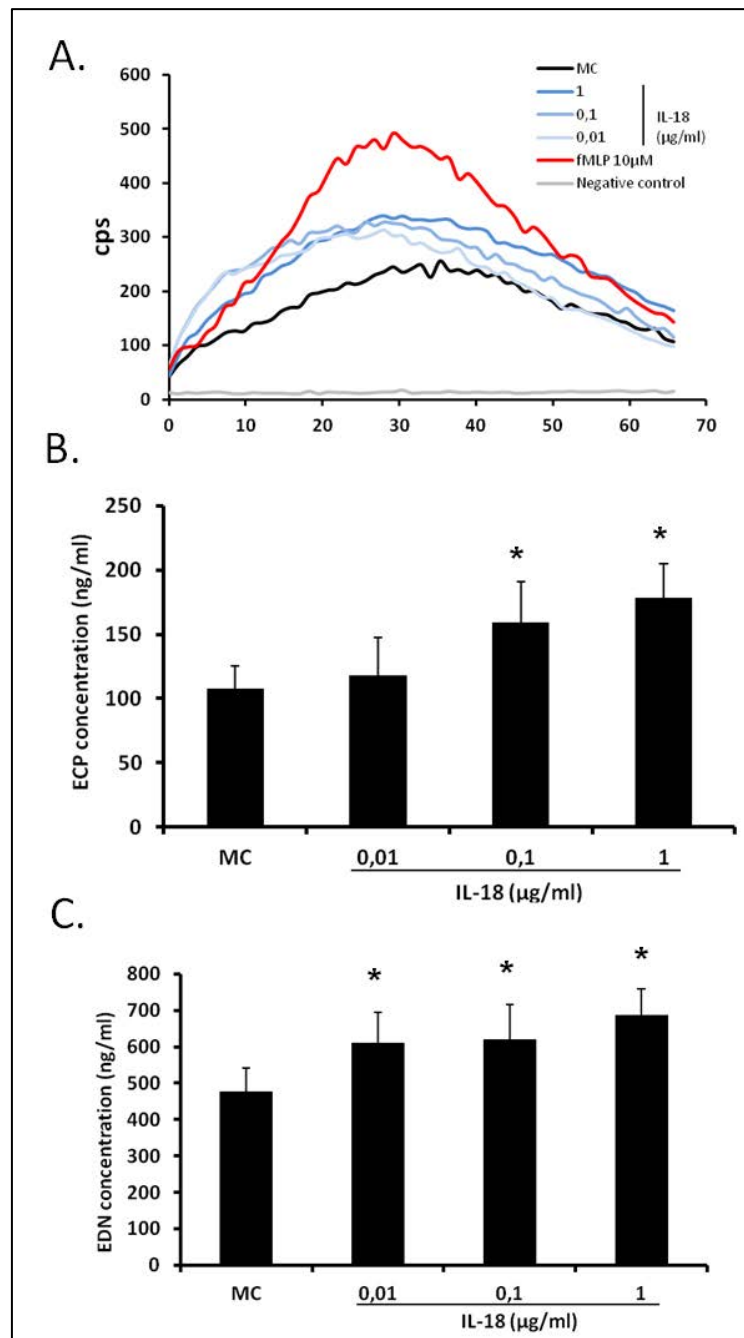
## **2. Activation par l'IL-18 : libération de ROS et de protéines cationiques**

La présence de ce récepteur permet de supposer que les éosinophiles sont capables de répondre à une stimulation par l'IL-18. Les précédentes études ont montré que l'IL-18 augmentait la survie des éosinophiles et entraînait la libération de cytokines et chimiokines, telles que l'IL-6, l'IL-8, la CXCL8 et la CCL2 (161,162). Ici, nous avons voulu déterminer si l'IL-18 est également capable d'induire la libération de médiateurs inflammatoires et cytotoxiques connus de l'éosinophile. Nous avons choisi de nous concentrer sur la libération extracellulaire des espèces réactives de l'oxygène (ROS), médiateurs néoformés, ainsi que sur la sécrétion de deux protéines cationiques, l'ECP et EDN. Ces médiateurs pouvant participer à l'immunité anti-tumorale.

Concernant les ROS, nous avons évalué leur libération par une technique de chimiluminescence en effectuant une cinétique d'une heure (cf M&M p.64). Une stimulation des éosinophiles par l'IL-18, conduit à une libération extrêmement rapide de ces médiateurs. En effet, après seulement cinq minutes de stimulation, l'IL-18 permet une sécrétion significative de ces médiateurs. Celle-ci augmente avec le temps pour atteindre son maximum entre 20 et 30 minutes de stimulation (Fig. 24A.). Après une heure, cette sécrétion retourne à son état basal.

Pour l'étude des protéines cationiques ECP et EDN, nous avons stimulé les éosinophiles avec de l'IL-18, pendant 18 heures, et nous avons ensuite récupéré les surnagants. Cette stimulation induit une libération significative à la fois d'ECP et d'EDN (Fig. 24B, 24C).

**Ces résultats suggèrent qu'une stimulation des éosinophiles par l'IL-18 conduit à la libération des médiateurs cytotoxiques de l'éosinophile.**



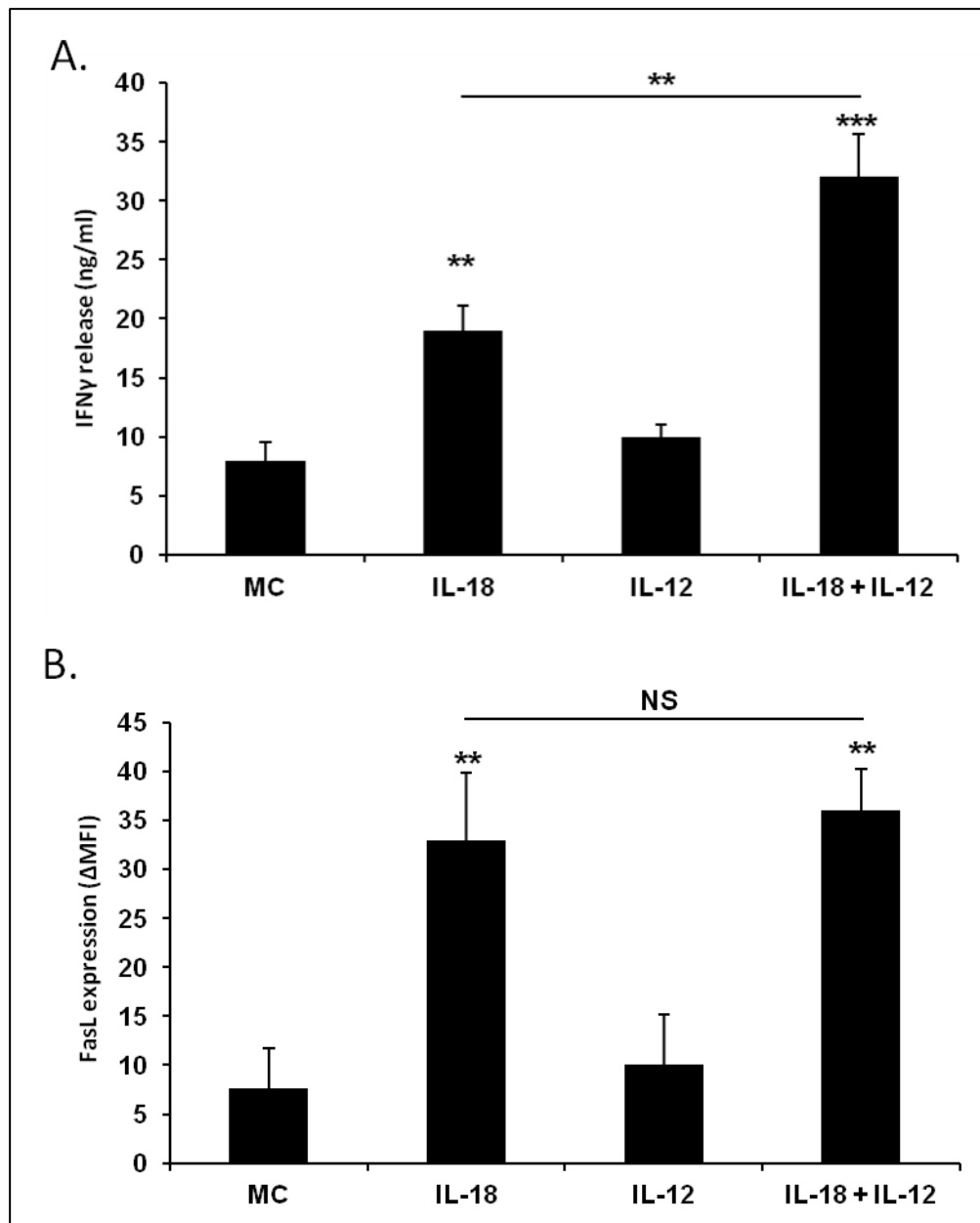
**Figure 24 : Libération de ROS et de protéines cationiques après stimulation des éosinophiles par l'IL-18**

(A) Graphique représentatif de la cinétique de la libération de ROS par les éosinophiles, par chimiluminescence au luminol après stimulation par de l'IL-18 (n=4). (B-C) Libération d'ECP (B) et d'EDN (C) dans les surnageants de culture après 18h de stimulation par l'IL-18 (n=6). Les résultats sont représentés par les moyennes  $\pm$  SEM. Le test de Wilcoxon a été utilisé \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ .



### 3. Activation par l'IL-18 : libération d'IFN $\gamma$ et expression de FasL

Les principales fonctions de l'IL-18 sur les lymphocytes et les cellules NK sont la libération d'IFN $\gamma$  et l'augmentation de l'expression de FasL (136). Ces deux molécules participent notamment à l'immunité anti-tumorale. Nous avons donc évalué la capacité des éosinophiles à exprimer ou libérer ces médiateurs après stimulation par l'IL-18.



**Figure 25 : Libération d'IFN $\gamma$  et expression de FasL par les éosinophiles.**

(A) La libération d'IFN $\gamma$  par les éosinophiles est évaluée dans les surnageants de culture, par ELISA, après stimulation par de l'IL-18 (50ng/ml) plus ou moins associée à de l'IL-12 (10ng/ml) (n=5). (B) L'expression membranaire de FasL est déterminée par cytométrie en flux après stimulation par de l'IL-18 +/- IL-12. Les résultats sont exprimés en  $\Delta$ MFI (n=5). Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM. Le test statistique de Wilcoxon a été utilisé \* p < 0.05; \*\* p < 0.01; \*\*\* p < 0.001, NS : non significatif.

La première fonction de l'IL-18 qui a été découverte, est sa capacité à induire la libération d'IFN $\gamma$  par les lymphocytes et les cellules NK (103). Cet effet est augmenté par addition de l'IL-12 (138). Les éosinophiles sont également capables de relarguer de l'IFN $\gamma$  notamment après une stimulation par le CD28 (62). Après stimulation de 18h, nous avons pu observer une libération d'IFN $\gamma$  dans les surnagants de culture. L'IL-12 n'induit pas la sécrétion d'IFN $\gamma$  mais potentialise l'effet de l'IL-18, la concentration libérée d'IFN $\gamma$  augmentant d'un facteur deux par cette double stimulation (Fig. 25A).

Une autre fonction de l'IL-18, toute aussi importante pour la cytotoxicité des cellules NK, est l'augmentation de l'expression de FasL qui conduit à l'apoptose les cellules exprimant le récepteur Fas (158). FasL est également exprimé sur les éosinophiles activés (261). En effet, alors que les éosinophiles n'expriment pas FasL en membrane en condition basale (%  $\Delta$ MFI < 10), une stimulation par l'IL-18 entraîne son expression (Fig. 25B). A la différence de la libération d'IFN $\gamma$ , l'IL-12 n'intervient pas dans cette régulation.

**Ces résultats suggèrent que les éosinophiles sont également capables de libérer et d'exprimer des molécules anti-tumorales en réponse à l'IL-18.**

### **III. Implication de l'IL-18 dans la cytotoxicité anti-tumorale des éosinophiles**

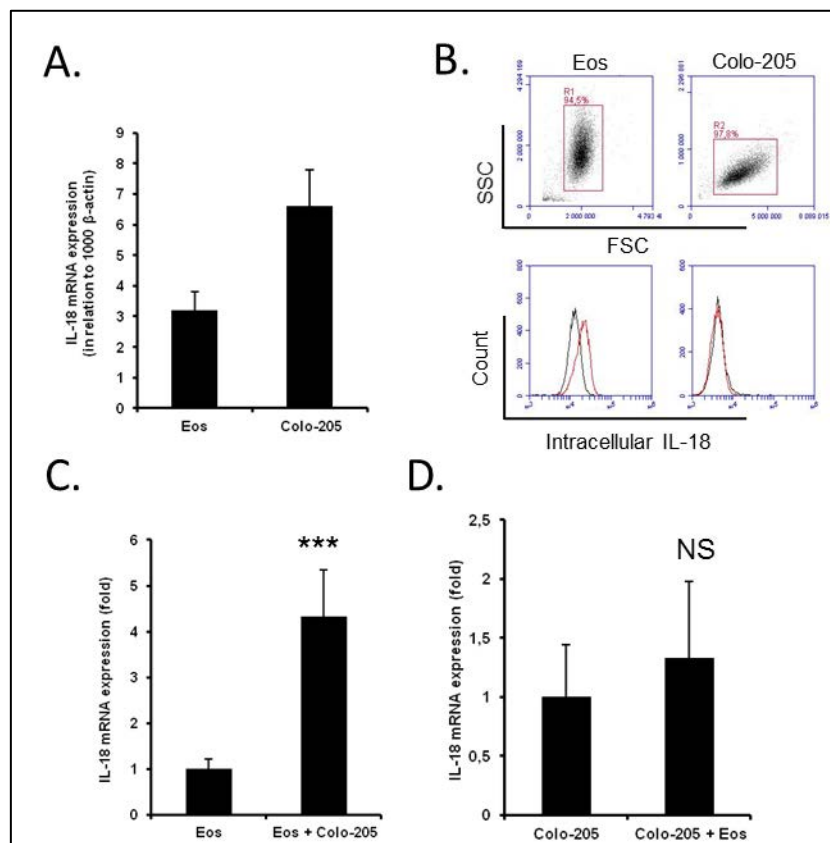
Nous avons vu précédemment que l'IL-18 aurait un effet protecteur dans plusieurs modèles murins de cancer du côlon. En effet, des tumeurs sont observées significativement plus fréquemment dans les côlons de souris *il-18<sup>-/-</sup>* (186,187). De plus, un transfert de gène de l'IL-18 augmente le rejet immunologique des tumeurs chez la souris (181,262). Au regard de nos résultats montrant que les éosinophiles induisent la mort cellulaire des Colo-205 et qu'ils sont stimulables par l'IL-18, nous avons étudié l'implication de cette cytokine dans le modèle *in vitro* de cytotoxicité.

#### **1. L'IL-18 est sur-exprimée dans les éosinophiles en contact avec les colo-205**

Tout d'abord, nous avons recherché l'expression d'IL-18 par les éosinophiles humains et les Colo-205 par des techniques de RT-PCR quantitative et de cytométrie en flux (Fig. 26A, 26B). Alors que les deux types cellulaires expriment l'ARNm de l'IL-18 (Fig. 26A), la protéine n'est détectable que dans l'espace intracellulaire des éosinophiles, en condition basale (Fig. 26B).

Afin d'évaluer son implication dans la cytotoxicité des éosinophiles vis-à-vis des Colo-205, nous avons évalué la variation d'expression de l'ARNm de l'IL-18 dans chaque population cellulaire après une co-incubation entre les éosinophiles et les Colo-205. En effet, après 3 heures d'incubation, les populations sont récupérées séparément puis une RT-PCR quantitative a été effectuée. Chez les éosinophiles, l'expression de l'ARNm de l'IL-18 est augmentée, d'un facteur de 4.3, lorsque ceux-ci sont en contact avec les Colo-205 (Fig. 26C). Aucun changement n'a été mis en évidence dans l'expression de l'IL-18 chez les Colo-205 (Fig. 26D).

**Ces résultats suggèrent que l'IL-18 est un médiateur présent dans le modèle de co-culture entre éosinophiles et Colo-205.**



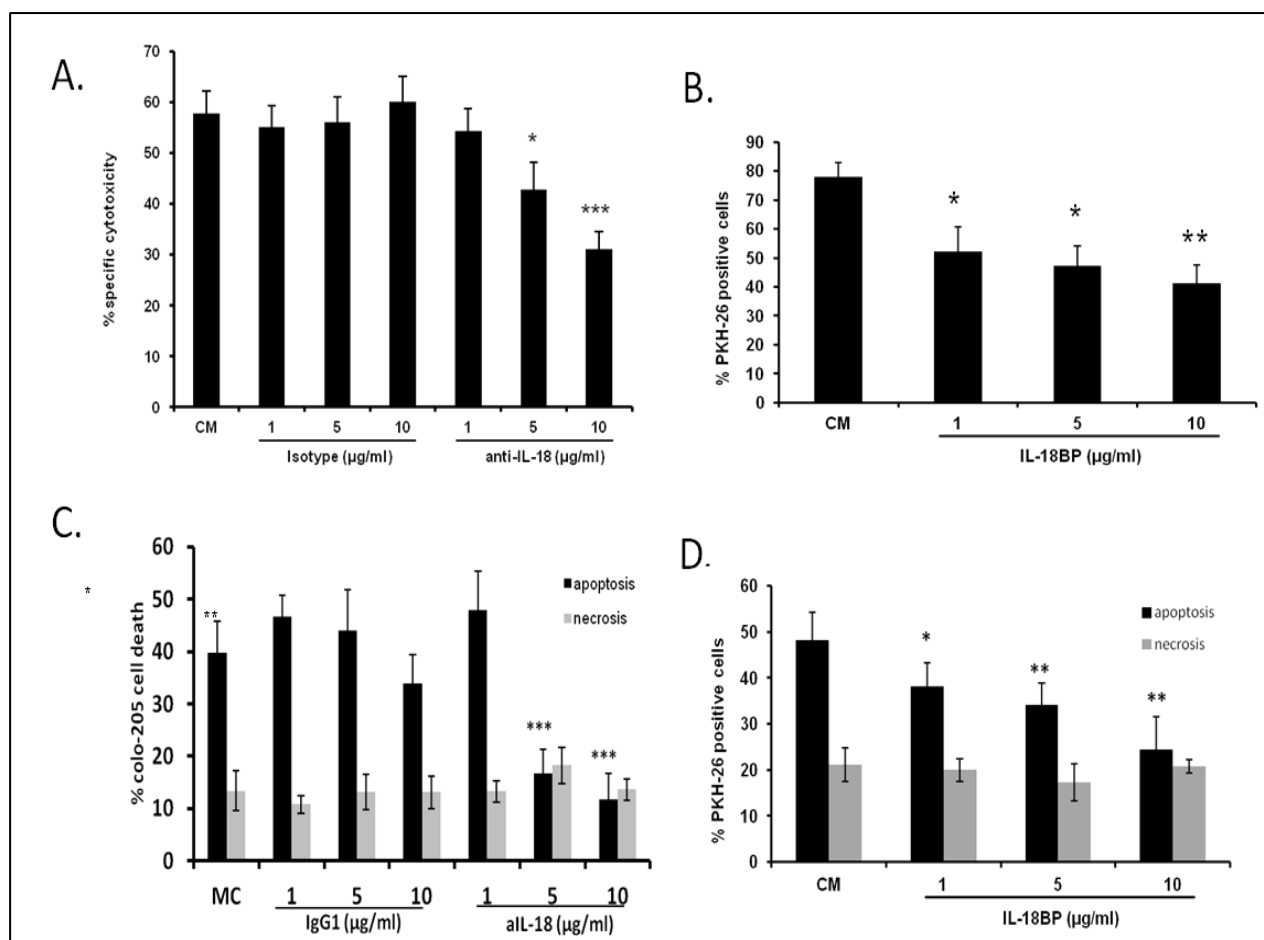
**Figure 26 : Expression de l'IL-18 dans les éosinophiles et les Colo-205.**

(A) L'expression de l'ARNm de l'IL-18 est analysée dans les éosinophiles humains (n=11) et les Colo-205 (n=6) par RT-PCR quantitative (2 expériences indépendantes). (B) Histogrammes représentatifs de 6 (pour les éosinophiles) ou 3 (pour les colo-205) expériences indépendantes de cytométrie en flux, montrant l'expression intracellulaire de l'IL-18. Les cellules marquées avec l'anticorps sont représentées par la ligne rouge. L'isotype contrôle est indiqué en noir. (C et D) Changement de l'expression de l'ARNm de l'IL-18 dans les éosinophiles, en présence ou non de Colo-205 (C) ou dans les Colo-205 en présence ou non d'éosinophiles (n=6) (2 expériences indépendantes). Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM. Le test statistique de Wilcoxon a été utilisé \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ , NS : non significatif.

## 2. L'IL-18 contribue à la cytotoxicité des éosinophiles vis-à-vis des Colo-205

Une variation de l'expression de l'IL-18 ayant été observée dans le modèle de co-culture entre éosinophiles et Colo-205, nous avons évalué son implication dans l'activité tumoricide des éosinophiles. Par cela, nous avons bloqué son action par l'utilisation d'un anticorps neutralisant anti-IL-18 et de l'IL-18BP $\alpha$  (IL-18 Binding Protein  $\alpha$ ), un inhibiteur naturel de l'IL-18.

Quel que soit l'inhibiteur de l'IL-18, nous avons observé une diminution significative dose-dépendante de la mort des Colo-205 induite par les éosinophiles (Fig. 27A, 27B). Pour l'anticorps neutralisant, la mort cellulaire diminue de près de 50% à la dose de 10 µg/ml après 1.5h de co-culture. L'affinité de l'IL-18 pour l'IL-18BPα est plus importante que celle-ci pour l'IL-18Rα. Même à une faible concentration, cette protéine diminue de 28% la cytotoxicité des éosinophiles envers les Colo-205 pour atteindre 50% aux concentrations les plus élevées.



**Figure 27 : Implication de l'IL-18 dans la cytotoxicité des éosinophiles**

(A et B) La mort des Colo-205 induite par les éosinophiles avec un anticorps neutralisant anti-IL-18 (n=16) (A), ou avec l'IL-18 BPα (n=5) (B). (C et D) La distinction entre apoptose (cellules Annexine V<sup>+</sup> / IP<sup>-</sup>) et nécrose (cellules annexine V<sup>+</sup> / IP<sup>+</sup>) a également été faite (n=7-5). Les données ont été obtenues après 1.5h de co-culture à un ratio E:T de 25:1. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM. Le test statistique de Wilcoxon a été utilisé \* p < 0.05; \*\* p < 0.01; \*\*\* p < 0.001, NS : non significatif.

Lorsque l'on s'intéresse aux différents types de mort cellulaire, l'inhibition de l'IL-18, par l'anticorps neutralisant ou l'IL-18 BPα, diminue drastiquement l'apoptose des Colo-205 induite par les éosinophiles de 71% et de 65% respectivement (Fig. 27C, 27D). A l'inverse,

cette inhibition n'induit aucun changement des taux de nécrose observés, aux concentrations et temps d'incubation utilisés (Fig. 27C, 27D).

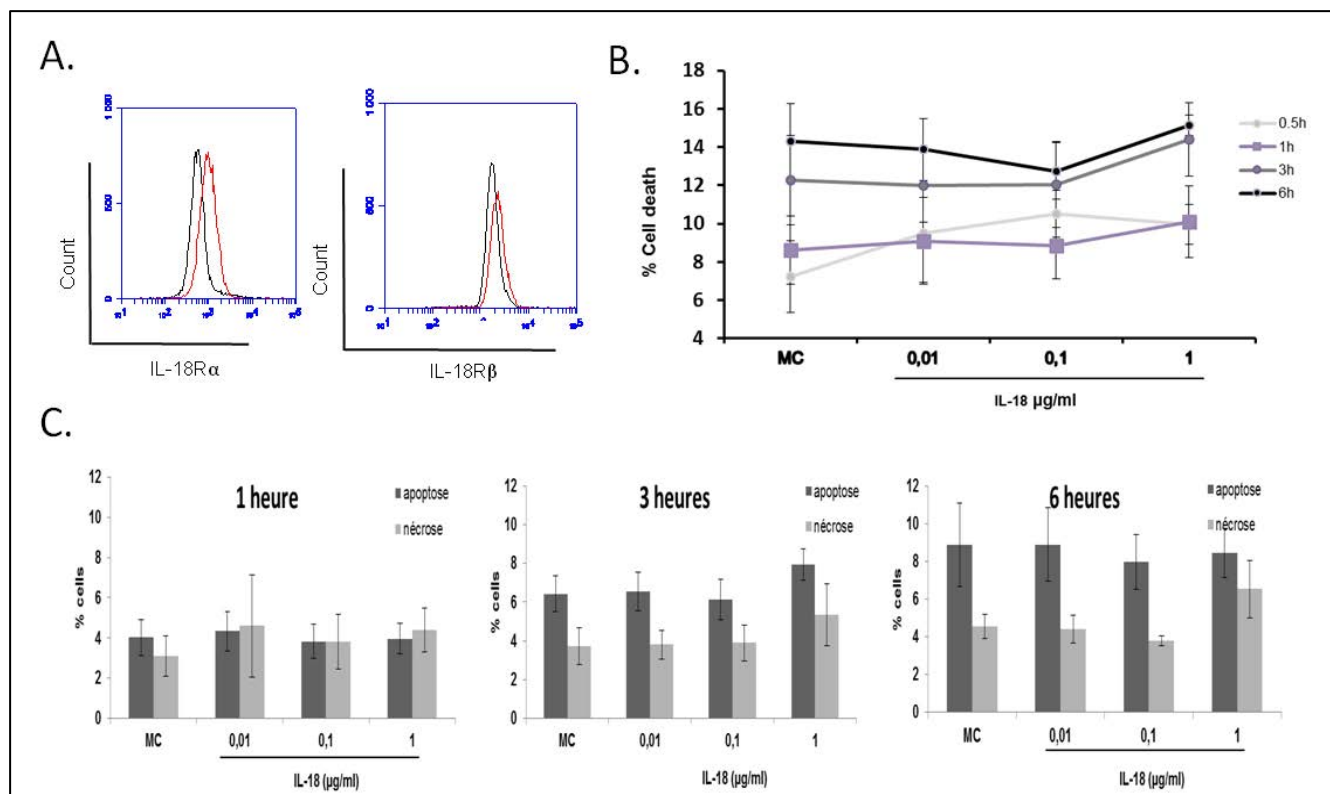
**Ces résultats suggèrent que l'IL-18 est impliquée dans l'activité cytotoxique des éosinophiles vis-à-vis des Colo-205.**

### **3.L'IL-18 n'induit pas directement la mort des Colo-205**

Afin de déterminer si l'IL-18 est capable d'avoir un effet direct sur la mort cellulaire des Colo-205, nous avons évalué, dans un premier temps, l'expression de l'IL-18R sur les Colo-205 par cytométrie en flux. Tout comme les éosinophiles, ces cellules expriment aussi bien l'IL-18R $\alpha$  que l'IL-18R $\beta$  en condition basale (Fig. 28A).

Lorsque les Colo-205 sont stimulées avec de l'IL-18, en absence d'éosinophiles, aucune variation de la mort cellulaire des Colo-205 n'a été observée, à tous les temps testés (Fig.28B). En discriminant l'apoptose et la nécrose, les mêmes constatations ont été faites (Fig. 28C).

**Ces résultats suggèrent un effet indirect de l'IL-18 dans la mort cellulaire des éosinophiles.**

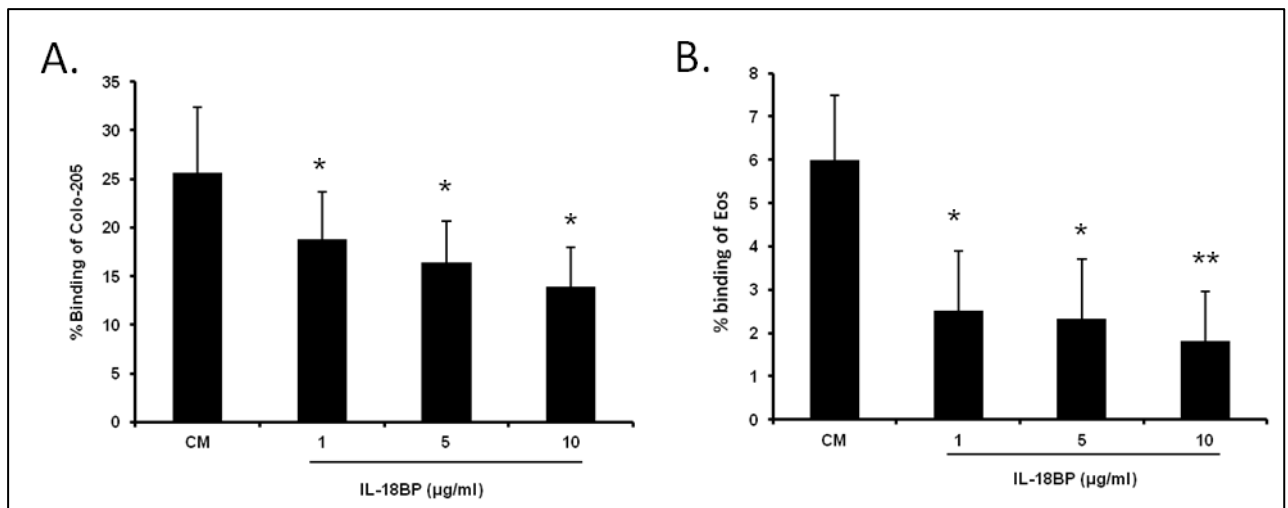


**Figure 28 ; Effet direct de l'IL-18 sur de la mort cellulaire des Colo-205**

(A) Histogrammes représentatifs de l'expression de l'IL-18Rα et de l'IL-18Rβ à la membrane des Colo-205 par cytométrie en flux (n=3). (B) Etude de la mort cellulaire des Colo-205 après incubation avec de l'IL-18 pendant 0.5, 1, 3 et 6h (n=5). (C) Discrimination de l'apoptose et la nécrose des colo-205 après stimulation par l'IL-18. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM. Le test de Wilcoxon a été fait. (n : nb d'expériences indépendantes)

#### 4. L'IL-18 est impliquée dans l'adhérence entre éosinophiles et Colo-205

L'inhibition de l'IL-18 conduit à la seule diminution de l'apoptose des Colo-205. Précédemment, nous avons évoqué le fait qu'un contact cellulaire, généralement à l'induction de ce mécanisme de mort cellulaire, est nécessaire à la cytotoxicité des éosinophiles vis-à-vis des Colo-205. De plus, l'IL-18 joue également un rôle dans la régulation de l'adhésion cellulaire (136). Nous avons donc cherché à déterminer si l'IL-18 est impliquée dans l'adhésion cellulaire entre les éosinophiles et les Colo-205.



**Figure 29 : L'IL-18 participe au contact entre éosinophiles et Colo-205.**

(A et B) Effet de l'inhibition de l'IL-18 sur la liaison entre éosinophiles et Colo-205. Les Colo-205 PKH26<sup>+</sup> et les éosinophiles CFSE<sup>+</sup> sont co-incubés à 37°C pendant 1.5h à un ratio E:T de 5:1 en présence d'IL-18 BPa (10µg/ml). Le contact entre les deux types cellulaire est déterminé par la population cellulaire double positive. Les pourcentages sont déterminés pour (A) la liaison des Colo-205 aux éosinophiles et (B) la liaison des éosinophiles aux Colo-205 (n=5). Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM. Le test statistique de Wilcoxon a été utilisé \* p< 0.05; \*\* p < 0.01; \*\*\* p < 0.001, NS : non significatif. (n : nb d'expériences indépendantes)

Après ajout d'IL-18BPa dans le modèle de co-culture éosinophiles / Colo-205, à un ratio E:T de 5:1, nous avons mesuré les pourcentages de liaison entre ces cellules après 1.5h d'incubation. L'inhibition de l'IL-18 avec l'IL-18BPa induit une diminution significative de cette interaction cellulaire (Fig. 29A, 29B). En effet, la liaison des Colo-205 est inhibée de 28 à 45% dans ces conditions, selon les concentrations utilisées (Fig. 29A). Lorsque l'on s'intéresse à la liaison des éosinophiles aux Colo-205, une diminution encore plus importante est observée. L'addition de l'IL-18BPa entraîne une diminution de 59 à 69.5% de ce contact (Fig. 29B).

**Ces résultats suggèrent que l'IL-18 est impliquée dans l'adhésion entre éosinophiles et Colo-205.**

## 5.L'IL-18 régule CD11a et ICAM-1

Etant donné l'implication de l'IL-18 dans l'adhérence entre éosinophiles et Colo-205 et l'expression de l'IL-18R sur ces deux types cellulaires, nous avons ensuite analysé, par

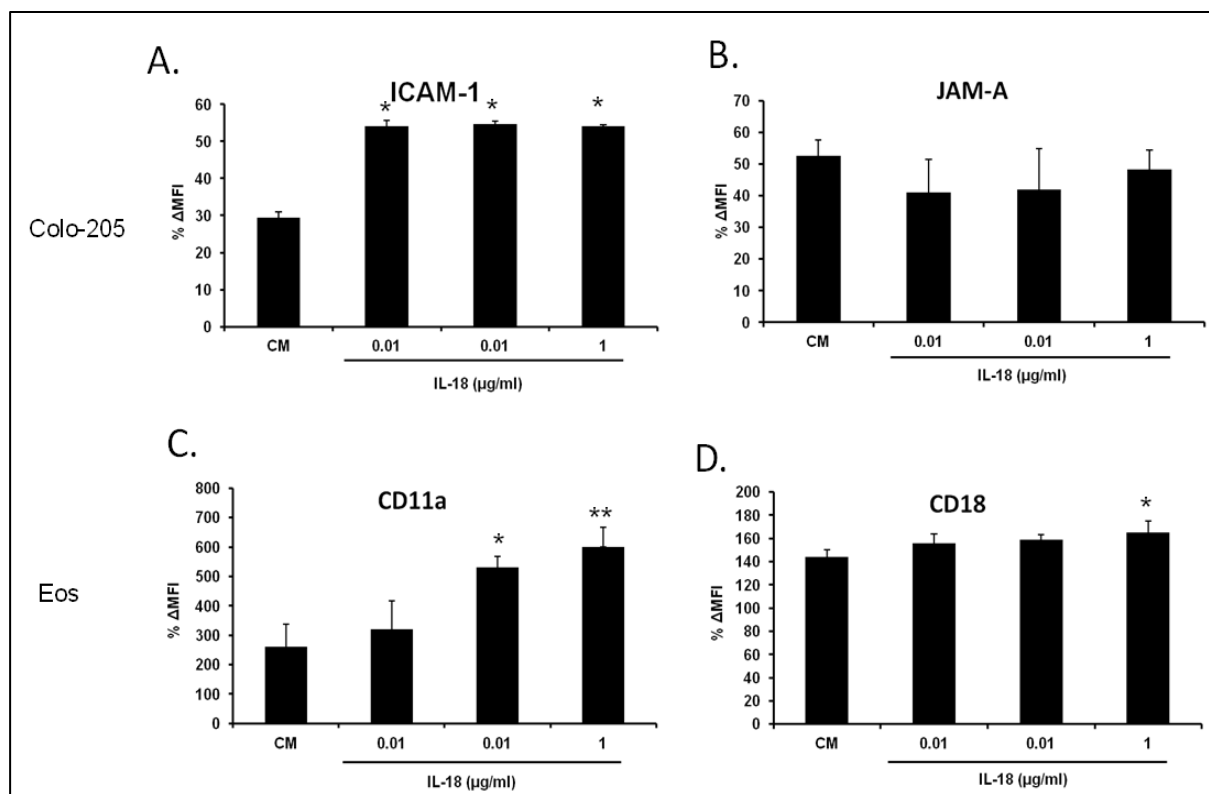


cytométrie en flux, l'effet de l'IL-18 sur l'expression des molécules d'adhérence participant au contact entre éosinophiles et Colo-205, déterminées précédemment : CD11a, CD18, ICAM-1 et JAM-A.

Sur les Colo-205, l'incubation avec de l'IL-18 recombinante pendant 1.5h conduit à une augmentation de l'expression membranaire d'ICAM-1 (Fig. 30A) alors qu'aucun changement dans l'expression de JAM-A n'a été observé (Fig. 30B).

Sur les éosinophiles, l'IL-18 entraîne une forte régulation du CD11a, qui est augmenté de plus de 50% (Fig. 30C). Dans une moindre mesure l'IL-18 induit également une augmentation de l'expression membranaire du CD18 (Fig. 30D).

**Ces résultats suggèrent que l'IL-18 agit sur les éosinophiles et les Colo-205 en régulant positivement l'expression des molécules, à la fois sur les cellules effectrices et les cellules cibles.**

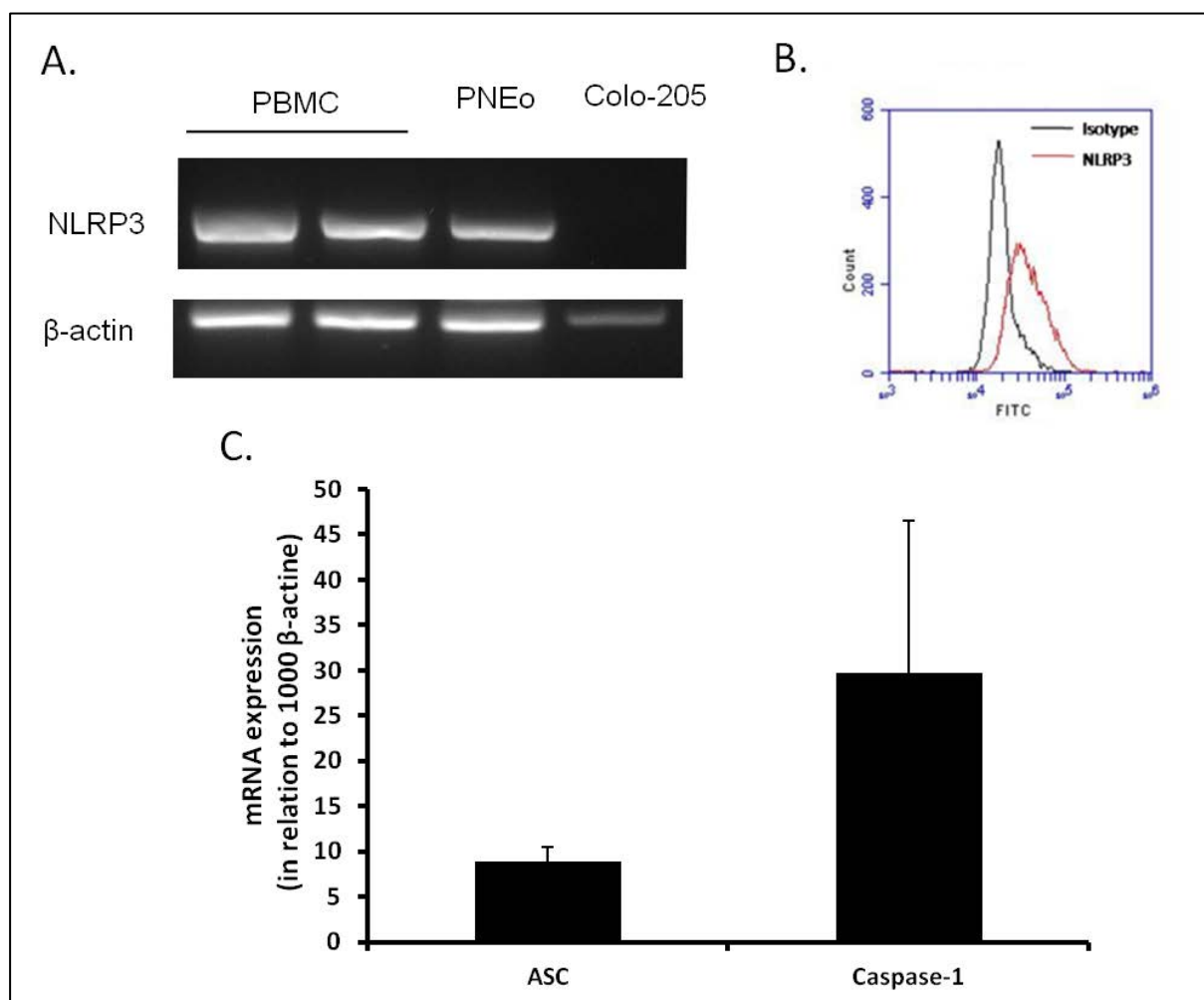


**Figure 30 : L'IL-18 régule positivement l'expression d'ICAM-1 et de CD11a.**

Les éosinophiles et les Colo-205 sont incubés pendant 1.5h à 37°C avec de l'IL-18 recombinante. Les données de cytométrie montrent l'expression membranaire sur les Colo-205 d'ICAM-1 (A) et de JAM-A (B) et sur les éosinophiles de CD11a (C) et CD18 (D). Les %ΔMFI sont représentés. Les résultats sont exprimés par la moyenne  $\pm$  SEM (n=4, nb d'expériences indépendantes). Le test statistique de Wilcoxon a été utilisé \* p< 0.05; \*\* p < 0.01; \*\*\* p < 0.001, NS : non significatif.

## 6. Les éosinophiles expriment l'inflammasome NLRP3

La pro-IL-18 nécessite d'être clivée pour être ensuite libérée sous forme active (112). Ce clivage se fait principalement par la caspase-1, elle-même clivée en forme active lors de la formation d'un complexe multi-protéique, l'inflammasome (117). Celui-ci est composé d'un récepteur de la famille des NLR, de l'ASC et de la caspase-1. L'inflammasome le plus étudié actuellement est l'inflammasome NLRP3. Celui-ci est d'autant plus intéressant qu'il semble également être impliqué dans l'immunité anti-tumorale vis-à-vis du cancer du côlon (187,188,263). Sa présence dans les éosinophiles ou les Colo-205 n'est actuellement pas connue, nous avons donc cherché à déterminer si ces cellules l'expriment.



**Figure 31 : Présence de l'inflammasome NLRP3 dans les éosinophiles humains**

(A et B) Figures représentatives de l'expression du NLRP3 dans les éosinophiles et les Colo-205 par RT-PCR (n=4) (A) et marquage intracellulaire de cytométrie en flux (n=8) (B). (C) Evaluation de la présence de l'ASC et de la caspase-1 dans les éosinophiles par RT-PCR quantitative (n=12).

Nous avons pu mettre en évidence la présence du NLRP3 chez les éosinophiles humains par RT-PCR et cytométrie en flux (Fig. 31A, 31B). Au contraire, nous n'avons pas observé la présence de ce récepteur chez les Colo-205 (Fig. 31A). Ces données ont été confirmées par la technique de RT-PCR quantitative.

L'inflammasome étant un complexe multiprotéique, nous nous sommes ensuite intéressés aux autres éléments de celui-ci. Par RT-PCR quantitative, nous avons observés la présence de l'ARNm à la fois de l'ASC et de la capsase-1 chez les éosinophiles humains (Fig. 31C).

#### **Ces résultats suggèrent la présence de l'inflammasome NLRP3 dans les éosinophiles.**

Ce dernier résultat ouvre de nouvelles perspectives quant à l'éventuelle implication de cet inflammasome dans l'immunité anti-tumorale des éosinophiles vis-à-vis des Colo-205.

### **IV. Conclusion de la partie expérimentale**

Au cours de ce travail, nous avons pu mettre en évidence que les éosinophiles humains sont doués d'une capacité tumoricide vis-à-vis de plusieurs lignées cellulaires tumorales. Celle-ci est particulièrement élevée envers les Colo-205, cellules de carcinome du côlon chez lesquelles les éosinophiles induisent leur apoptose et nécrose, par un mécanisme impliquant notamment un contact cellulaire via la liaison LFA-1 et ICAM-1.

Nous avons également identifié un nouveau médiateur moléculaire, L'IL-18, impliqué dans cette activité cytotoxique, notamment en favorisant le contact entre éosinophiles et Colo-205. Cette cytokine est également capable de stimuler les éosinophiles en induisant la libération de nombreux médiateurs et l'expression de FasL. L'implication de ces molécules cytotoxiques reste à être démontrée dans ce modèle (Fig. 32).

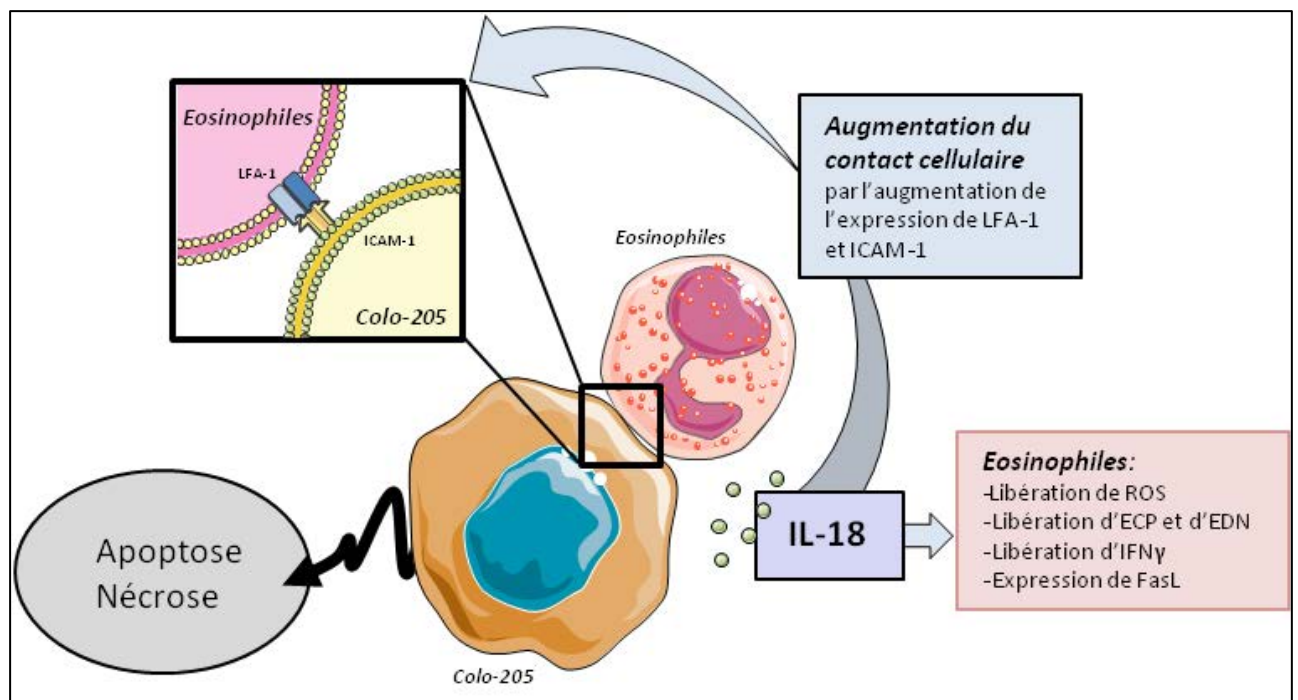


Figure 32 : Schéma récapitulatif de la partie expérimentale

## DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Notre étude avait pour but de développer les connaissances actuelles sur les propriétés anti-tumorales des éosinophiles humains, notamment dans le contexte du cancer du côlon, par l'étude des mécanismes moléculaires mis en jeu dans l'activité cytotoxique anti-tumorale de ces cellules.

Nos résultats montrent tout d'abord que les éosinophiles sont capables d'induire *in vitro* la mort cellulaire de plusieurs lignées tumorales humaines suggérant donc leur implication dans l'immunité anti-tumorale (**point 1**). L'adhérence, avec l'implication de LFA-1 sur les éosinophiles et d'ICAM-1 sur les Colo-205, semble notamment avoir un rôle prépondérant dans cette activité (**point 2**). Nous avons également pu observer une réelle hétérogénéité fonctionnelle de ces cellules, que ce soit selon les différentes lignées cellulaires ou selon le statut des donneurs (**point 3**).

Dans notre modèle, l'IL-18 semble être un nouveau médiateur favorisant la cytotoxicité anti-tumorale des éosinophiles. Cela soulève alors la question de l'implication des inflammasomes ainsi que des molécules et récepteurs impliquées dans la libération de l'IL-18, dans ce contexte (**point 4**). Enfin, nous nous intéresserons au rôle des éosinophiles en thérapeutique (**point 5**).

### **Point 1 : Immunité anti-tumorale et éosinophiles**

- **Rôle des éosinophiles dans l'immunité anti-tumorale: immunosurveillance, clairance et remodelage**

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés au potentiel cytotoxique des éosinophiles humains, dans un modèle *in vitro*, vis-à-vis de quelques lignées cellulaires tumorales humaines et plus particulièrement d'une lignée de carcinome du côlon, les Colo-205. Cependant, ces cellules pourraient intervenir dans l'immunité anti-tumorale également par leurs autres fonctions telles que leur capacité d'immuno-régulation ou de remodelage tissulaire. La question du stade de la pathologie pendant lequel s'effectue le recrutement des éosinophiles peut également être posée : les éosinophiles participent-ils à l'immunosurveillance ou sont-ils des cellules effectrices terminales ?

### *Eosinophiles et immunosurveillance*

Au début du XXème siècle, Paul Ehrlich fût le premier à suggérer que le système immunitaire était capable de réguler le développement tumoral, et donc de protéger l'hôte des pathologies néoplasiques. L'hypothèse d'immunosurveillance fût ensuite décrite par Burnet et Thomas (203). Cependant, les individus immunocompétents développent également des cancers. Ce fait a été expliqué par la démonstration que le système immunitaire participe aussi à la protection vis-à-vis des tumeurs mais également sélectionne certaines tumeurs présentant une faible tumorigenicité, contribuant ainsi à promouvoir la croissance tumorale. Ces constatations ont abouti à abandonner l'hypothèse d'immunosurveillance pour le concept de « cancer immunoediting » (194). Ce dernier est un processus dynamique composé de trois phases : une première phase d'élimination (correspondant à l'immunosurveillance), une phase d'équilibre et une dernière phase d'échappement. La phase d'élimination est considérée comme complète lorsque toutes les cellules cancéreuses sont complètement éradiquées.

Plusieurs études ont placé les éosinophiles en première ligne de défense contre le développement tumoral, contribuant ainsi à la phase d'élimination. En effet, une étude épidémiologique a démontré que le nombre d'éosinophiles sanguins était inversement corrélé à l'incidence du cancer du côlon (216). Dans une étude visant à étudier la localisation de l'éosinophilie tissulaire dans un modèle de mélanome murin, il a été observé que cette infiltration était un phénomène très précoce et persistant au cours de la pathologie (233). Le rôle potentiel des éosinophiles dans l'immunosurveillance anti-tumorale a été également étayé par une étude s'intéressant à l'incidence de fibrosarcome dans différents modèles animaux génétiquement modifiés : (1) Souris IL-5 transgéniques (IL-5Tg) ayant un taux d'éosinophiles élevé, (2) Souris *Ccl11*<sup>-/-</sup> chez lesquelles le recrutement tissulaire des éosinophiles ne se fait plus et (3) Souris  $\Delta$ dblGATA et *Ccl11/Il5*<sup>-/-</sup>, déficientes en éosinophiles. L'incidence tumorale est significativement diminuée chez les souris IL-5Tg. A l'inverse les souris *Ccl11*<sup>-/-</sup>,  $\Delta$ dblGATA et *Ccl11/Il5*<sup>-/-</sup> développent un grand nombre de sarcome (247).

Les mécanismes impliqués dans ces modèles n'ont pas été déterminés, cependant la capacité des éosinophiles à intégrer et à répondre aux signaux de dangers ainsi que leur fonction cytotoxique supportent l'hypothèse de leur implication dans la phase d'élimination des cellules tumorales.

- **Alarmines :** Ces molécules, également appelés DAMPs, sont des signaux de dangers. Leur libération se fait activement et rapidement par les leucocytes stimulés ou passivement par les cellules nécrotiques (mais non apoptotiques). Les éosinophiles sont capables de répondre à la stimulation par de nombreuses alarmines. Parmi elles, on peut notamment citer l'effet anti-tumoral de l'IL-33 et de la HMGB1.
  - L'IL-33, est également une cytokine de la famille de l'IL-1 dont l'activité anti-tumorale commence à être reconnue. En effet, l'IL-33 diminue la croissance tumorale en augmentant la sécrétion d'IFN $\gamma$  par les lymphocytes CD8<sup>+</sup> et les cellules NK (264). Dans un modèle de cancer du côlon, l'inactivation de l'IL-33 augmente la susceptibilité des souris à développer un cancer. Les éosinophiles et les ILC2 semblent être les principaux acteurs cellulaires de cet effet de l'IL-33 (239).
  - Le rôle de la HMGB1 reste plus controversé. En effet, la HMGB1 pourrait avoir un rôle pro-tumoral par induction de l'angiogenèse par la stimulation du récepteur RAGE (Receptor for Advanced Glycation End products) (265,266). Cependant, cette alarmine pourrait également avoir un effet anti-tumoral, notamment en stimulant la présentation antigénique des cellules dendritiques via le TLR4 ou le TLR2 (267). Il est à noter que les éosinophiles expriment tous ces récepteurs (31,268).
- **Cytotoxicité :** Nous avons vu précédemment que les éosinophiles exercent une fonction cytotoxique importante notamment vis-à-vis des cibles tumorales. Celle-ci pourrait être médiée par de nombreux récepteurs :
  - (1) Récepteurs pour les fragments Fc des immunoglobulines (FcR). Les tumeurs expriment des antigènes qui leur sont spécifiques (68). Après reconnaissance de ces antigènes par des IgE ou des IgA, les éosinophiles pourraient induire une cytotoxicité dépendante des anticorps (ADCC), comme décrite vis-à-vis des helminthes (269,270)
  - (2) TCR $\gamma\delta$ . Les lymphocytes  $\gamma\delta$  ont une activité anti-tumorale largement reconnue (271). Dans notre laboratoire, il a été mis en évidence la présence du TCR $\gamma\delta$  sur les éosinophiles et son implication dans leur cytotoxicité anti-tumorale (36). Il est intéressant de noter que, dans ce contexte, l'intervention de ce récepteur diminue au cours temps de co-incubation entre éosinophiles et Colo-205 (272).
  - (3) TLR2 et TLR4. Ces récepteurs de l'immunité innée, exprimés par les éosinophiles, sont potentiellement impliqués dans l'immunité anti-tumorale (273)

- (4) 2B4 et NKG2D. Ces récepteurs sont communs aux éosinophiles, aux lymphocytes  $\gamma\delta$  et aux cellules NK et leur implication dans l'immunité anti-tumorale est connue (274–276).

Ainsi, les éosinophiles présentent toutes les caractéristiques permettant leur implication dans la première phase d'élimination de la théorie du « cancer immunoediting ».

#### *Eosinophiles et remodelage/réparation tissulaire*

Une fois, les cellules tumorales éliminées, il se met en place un mécanisme, plus tardif, de remodelage et de réparation tissulaire. Les éosinophiles pourraient également participer à cette étape. En effet, ces cellules sont principalement retrouvées au niveau des zones de nécrose des tumeurs (233). De plus, les cellules tumorales stressées et nécrosées sont capables d'induire la migration des éosinophiles *in vitro* et *in vivo* (27,233). Le concept de « LIAR hypothesis », défini précédemment (Cf § I.4.5 p.18) permet d'expliquer cette fonction des éosinophiles (20). Celle-ci pourrait notamment être due aux différents facteurs de croissance libérés par les éosinophiles (66) mais également aux propriétés ARNases des protéines cationiques ECP et EDN (58).

Dans le cas du cancer du côlon, l'éosinophilie tissulaire en fonction du stade de la pathologie, ainsi que leurs fonctions pourrait être déterminée *in vivo* dans différents modèles animaux (cf. § ci-dessous).

#### **- Limites de notre modèle in vitro**

La caractérisation *in vitro* des propriétés de l'éosinophile activé est une étape essentielle à la compréhension du rôle joué par ces cellules. Les méthodologies actuelles disponibles pour caractériser l'éosinophile permettent de révéler les modifications morphologiques, métaboliques, phénotypiques et fonctionnelles induites par l'environnement dans lequel se trouvait la cellule *in vivo* avant son isolement. Les expériences *in vitro* offrent l'avantage de travailler directement sur des cellules humaines mais possèdent aussi leurs limites.



### Technique de purification

L'une des premières limites est liée à la technique d'isolement des éosinophiles. En effet, les étapes de lyse osmotique ainsi que celles de purification de ces cellules peuvent entraîner des modifications en induisant par exemple un stress cellulaire et un niveau basal d'activation des éosinophiles purifiés. D'autre part, l'utilisation de la méthode de purification par sélection négative des éosinophiles CD16<sup>-</sup> conduit à l'élimination des éosinophiles CD16<sup>+</sup>, population certes très faible en quantité mais qui pourrait, au moins dans la maladie allergique, représenter une sous-population fonctionnellement importante (277). Cependant, il n'existe pas, à ce jour, d'autre technique de purification puisqu'aucun récepteur membranaire spécifique aux éosinophiles n'a pu être mis en évidence. Un autre paramètre à prendre en compte est le faible pourcentage d'éosinophiles sanguins, notamment dans le sang des sujets sains, rendant difficile la purification et limitant le nombre d'expériences.

### Eosinophiles sanguins et éosinophiles tissulaires

Il faut garder en mémoire que les éosinophiles sont des cellules à localisation majoritairement tissulaire, les éosinophiles humains sanguins représentant moins de 0.5% du nombre total d'éosinophiles. Il existe de véritables différences phénotypiques entre ces deux populations (278,279). En effet, les études réalisées sur les éosinophiles purifiés du sang périphérique ne prennent malheureusement pas en compte l'influence du microenvironnement tissulaire sur le phénotype membranaire des éosinophiles et sur leurs capacités activatrices. Des techniques de purification d'éosinophiles tissulaires existent, notamment nasaux (279,280). Cependant, la qualité de ces techniques en termes de pureté et de viabilité des éosinophiles n'est pas satisfaisante pour effectuer des expériences fonctionnelles, comme c'est le cas dans notre modèle. Une alternative pourrait être l'approche *in situ* par l'utilisation de la microdissection au laser qui devrait permettre de mieux appréhender le rôle des éosinophiles tissulaires en tant que cellule effectrice et régulatrice de l'immunité.

### Modèles *in vitro* versus modèles *in vivo*

Une autre alternative pour étudier le rôle des éosinophiles dans un contexte pathologique est l'utilisation de modèles animaux. La majorité des études *in vivo* utilisent des modèles de souris. Cependant, pour l'étude des éosinophiles, les modèles de rats semblent plus pertinents, avec cependant des difficultés pour se fournir en réactifs appropriés ou en

modèles génétiquement modifiés. En effet, il existe de réelles différences entre les éosinophiles humains et de souris en termes de phénotype (249). Par exemple, les éosinophiles de souris n'expriment pas le TCR $\gamma\delta$ , récepteur potentiellement impliqué dans l'effet cytotoxique des éosinophiles humains (36). Un autre exemple est celui du Fc $\alpha$ RI (CD89), présent sur les éosinophiles humains et de rats mais absent sur les éosinophiles de souris (248).

Actuellement, quelques études *in vivo* étayaient l'hypothèse d'une participation des éosinophiles à l'immunité anti-tumorale. Cependant, ces études ne se sont intéressées qu'au rôle indirect de ces cellules notamment après immunothérapie (94,239). Plusieurs modèles existent pour (1) étudier le cancer du côlon et (2) pour abolir, limiter ou augmenter la population éosinophiles. La combinaison de ces modèles devrait permettre d'étudier le rôle direct de ces cellules dans cette pathologie.

- **Modèles de cancer du côlon chez le rat:** Des modèles murins ont été développés pour mimer la pathologie humaine et caractériser le rôle de l'inflammation au cours du développement du cancer du côlon. Un des modèles les plus utilisés pour mimer le développement du CAC (cancer associé à une colite) repose sur l'administration d'un carcinogène, ayant un tropisme avéré pour le côlon: l'Azoxyméthane (AOM), accompagnée de traitements répétés avec du Dextran Sodium Sulfate (DSS) (281). Un autre modèle est l'utilisation des rats Pirc, qui présentent des mutations sur le gène *Apc* (Adenomatous polyposis coli). A la différence des modèles de souris présentant des mutations du gène *Apc*, qui développent des tumeurs au niveau de l'intestin sans distinction de sexe, les rats Pirc présentent une susceptibilité liée au sexe et une localisation colique des tumeurs, caractéristiques retrouvées dans la pathologie humaine (282).
- **Modulation du nombre d'éosinophiles chez le rat:** Les modèles génétiques déficients en éosinophiles n'existent que chez la souris. Cependant, l'injection d'IL-5 seule ou associée à du GM-CSF, facteurs nécessaires à l'éosinophilie, permet d'induire une éosinophilie. De même, il est possible d'inhiber le recrutement de cette population par injection d'un anticorps neutralisant anti-IL-5 (283). Une autre possibilité pour diminuer le nombre d'éosinophile est l'injection d'un anticorps dirigé contre le siglec F, analogue du siglec 8 humain, récepteur inhibiteur conduisant à l'apoptose des éosinophiles et mastocytes (284).

## **Point 2 : Adhérence cellulaire**

### **- Adhérence et cytotoxicité des éosinophiles**

Comme les lymphocytes ou les cellules NK, l'adhérence cellulaire est souvent impliquée dans la cytotoxicité anti-infectieuse ou anti-tumorale des éosinophiles. En effet, la cytotoxicité des éosinophiles vis-à-vis de larves de *Schistosoma mansoni* fait intervenir, en plus des FcR, des sélectines (269). Celles-ci reconnaissent des dérivés sulfatés et sialylés, dont le Lewis X, présent sur le parasite. L'intervention d'intégrines dans la cytotoxicité des éosinophiles a également été décrite. Par exemple, le CD11b reconnaît le  $\beta$ -glucane du champignon *Alternaria alternata* et induit la libération d'EDN et de MBP par les éosinophiles (285). Dans l'immunité anti-tumorale, par des analyse de microscopie électronique, il a été observé que les éosinophiles sont au contact des tumeurs et qu'ils sont dégranulés, signe de leur activation (240). Dans notre laboratoire, il a été démontré que la cytotoxicité des éosinophiles, envers les colo-205, est dépendante de l'intégrine LFA-1 (CD11a/CD18) à la membrane des éosinophiles (250).

L'interaction entre LFA-1 et ses ligands, ICAMs 1-3 et JAM-A, conduit à la liaison de leucocytes à leurs cellules cibles (259,286). Nos résultats ont mis en évidence que, en condition basale, les Colo-205 expriment ICAM-1 et JAM-A. Ces deux ligands contribuent à la liaison cellulaire mais seul ICAM-1 est impliquée dans l'activité cytotoxique des éosinophiles sur les Colo-205. JAM-A est une glycoprotéine transmembranaire appartenant à la super-famille des immunoglobulines. JAM-A est largement distribuée au niveau des tissus, notamment au niveau du tractus gastro-intestinal (260). Cette protéine peut former des hétérodimères avec LFA-1 mais peut également former des homodimères. Ces interactions homophilique sont impliquées dans divers processus cellulaires dont l'adhésion cellulaire (287). Cette liaison JAM-A/JAM-A pourrait également être impliquée dans une interaction Colo-205/Colo-205 dans notre modèle d'adhésion cellulaire.

### **- Rôle d'ICAM-1 dans la cytotoxicité anti-tumorale**

A la différence de JAM-A, ICAM-1, ligand connu de LFA-1 (259), et que cette molécule d'adhérence est impliquée dans la cytotoxicité des éosinophiles. Bien que le rôle d'ICAM-1 ait été incriminé dans la progression tumorale, notamment en favorisant les métastases (288,289), de plus en plus d'études suggèrent qu'ICAM-1, exprimé par les cellules cancéreuses, favorise la cytotoxicité anti-tumorale, notamment des cellules NK et des

lymphocytes T (290). En effet, l'inhibition d'ICAM-1 par des anticorps neutralisants ou des siRNA conduit à la diminution d'adhérence entre les lymphocytes ou les cellules NK et les cellules tumorales ainsi qu'à la diminution de leur cytotoxicité (291–293). De la même manière, une augmentation de son expression augmente la susceptibilité des cellules cancéreuses à l'adhésion avec les leucocytes et donc à la cytotoxicité dépendante du contact cellulaire (294,295). Il semblerait qu'ICAM-1 soit également impliqué dans l'ADCC des cellules NK (296).

#### **- Modulation de l'adhérence par l'IL-18**

Nos résultats suggèrent que l'implication de l'IL-18 dans la cytotoxicité anti-tumorale des éosinophiles soit notamment due à une modulation de l'adhérence cellules cibles / cellules effectrices. Nous observons, en effet, une augmentation de l'expression d'ICAM-1 sur les Colo-205 et de CD11a sur les éosinophiles après stimulation par de l'IL-18. Une étude précédente a démontré que l'adhésion cellulaire était nécessaire à son activité anti-tumorale (281). Le taux d'ICAM-1 sur des cellules tumorales humaines, obtenues après chirurgie de cancer de la vessie ou du rein, est corrélé avec l'infiltration leucocytaire dans ces tumeurs (297). De plus, la stimulation de lignées cellulaires de carcinome de la vessie ou rénal par de l'IFN $\gamma$  conduit à une augmentation de l'expression d'ICAM-1 sur ces cellules (297). Cette étude suggère que les cytokines, produites par l'infiltrat leucocytaire, pourraient influencer l'expression d'ICAM-1 sur les cellules tumorales. La modulation de l'expression d'ICAM-1 par l'IL-18 a également été démontrée sur les monocytes et sur certaines cellules cancéreuses (295,298,299).

### **Point 3 : Hétérogénéité des éosinophiles**

#### **- Plusieurs populations d'éosinophiles ?**

Nous avons vu précédemment que les éosinophiles sont des leucocytes capables de polariser la réponse immunitaire par la libération de cytokines de type Th1, Th2, Th17 ou immuno-régulatrices comme l'IL-10. A l'instar des macrophages M1 / M2 (300), existerait-il deux populations d'éosinophiles Eo1 / Eo2, hypothèse envisagée un moment (301) ? En effet, on pourrait imaginer l'existence de deux sous-populations stockant soit des cytokines de type Th1, soit des cytokines de type Th2, une population prenant le pas sur l'autre selon les stimuli. Cependant, des expériences de double marquage ont montré que toutes ces cytokines

coexistaient dans les éosinophiles (302). Il semble donc que ce soit plutôt le milieu environnant et la présence de ligands activateurs / inhibiteurs, se fixant aux différents récepteurs, qui soient responsables du processus d'immuno-régulation (62), bien que les mécanismes moléculaires n'aient pas encore été identifiés.

- **Hétérogénéité fonctionnelle selon les donneurs**

Dans notre étude, nous avons observé une importante hétérogénéité fonctionnelle selon le statut de donneurs chez lesquels les éosinophiles ont été purifiés. En effet, les éosinophiles de sujets allergiques semblent plus cytotoxiques que les éosinophiles des sujets « sains ». A l'inverse, les éosinophiles des sujets SHE induisent moins de mort cellulaire des Colo-205.

Sujets allergiques

Nous avons vu précédemment en détail le concept d'Allergo-Oncologie (cf. § III.2.4 p.52) basé sur la relation positive entre allergie et cancer (251). Dans cette partie, nous nous intéresserons donc plutôt aux hypothèses pouvant expliquer cette cytotoxicité accrue chez ces éosinophiles.

- (1) Il est possible que le contexte inflammatoire allergique sensibilise *in vivo* les éosinophiles, les rendant plus à même d'être cytotoxiques vis-à-vis des cibles tumorales. Cependant, nous avons testé l'effet modulateur de l'IL-5 et n'avons pas remarqué d'effet significatif. Nous n'avons également pas observé d'effet après stimulation des éosinophiles par les allergènes correspondant à l'allergie du donneur. Ce travail a notamment été effectué, en collaboration avec Caroline Stremnizer (PhD international, Université de Vienne, Pr. Erika Jensen-Jarolim)
- (2) Nous pouvons également envisager que les éosinophiles de donneurs allergiques expriment à leur surface un récepteur particulier ou présente une expression augmentée de certaines molécules. Par exemple, les éosinophiles expriment le FcεRI et de l'IgE cytophile est détectée sur les éosinophiles de patients allergiques (60). Un mécanisme d'ADCC via le FcεRI pourrait donc peut-être intervenir. Nous avons également montré que les patients allergiques ont un taux plus élevé de CD11a et de CD18. Etant donné l'importance de l'adhérence dans l'activité cytotoxique des éosinophiles, cela pourrait être un début d'explication pour cette hétérogénéité.

(3) Il pourrait également avoir un effet des polymorphismes des protéines cationiques. S'il est connu que certains polymorphismes entraînent une variation du contenu cellulaire de l'ECP, ces polymorphismes n'ont pas été reliés à un statut allergique (53). En revanche, on peut supposer que l'ECP des donneurs allergiques présente des propriétés cytotoxiques supérieures à la moyenne, une corrélation ayant été retrouvée entre un génotype particulier de l'ECP et la présence de désordres allergiques (54,303). Concernant l'EDN, nous ne savons pas s'il existe une forme protéique plus cytotoxique associée à l'allergie. D'un point de vue quantitatif, le stock intracellulaire semble être augmenté chez des donneurs asthmatiques (304).

### Donneurs SHE

En général, nous avons confirmé que les éosinophiles issus de donneurs SHE sont moins cytotoxiques vis-à-vis des Colo-205. Cependant, nous avons pu observer également une hétérogénéité au sein de ce groupe. En effet, certains patients présentent une activité cytotoxique supérieure à la moyenne établie sur le groupe de donneurs normaux. Le SHE est une pathologie complexe constituée de plusieurs variants (myéloprolifératif, lymphoprolifératif et idiopathique) et est très hétérogène. Beaucoup de zones d'ombres subsistent encore dans cette pathologie, notamment en ce qui concerne les différences de gravité dans les signes cliniques attribuables peut-être à un potentiel cytotoxique exacerbé ou non de l'éosinophile.

#### **- Hétérogénéité selon la cible tumorale**

En accord avec les études épidémiologies montrant que la présence d'une TATE peut être soit associée à un facteur pronostique favorable, soit à un facteur pronostique défavorable, nous avons observé une différence de cytotoxicité des éosinophiles selon la cible tumorale. Les mécanismes environnementaux, cellulaires, moléculaires et génétiques sont très variables d'un type tumoral à l'autre. Il est donc extrêmement compliqué de déterminer les facteurs, certainement nombreux, expliquant cette hétérogénéité.

#### **Point 4 : IL-18 et activité anti-tumorale des éosinophiles**

Cette cytokine multifonctionnelle a un rôle controversé dans l'immunité anti-tumorale (180). D'un côté, l'IL-18 facilite l'échappement des cellules cancéreuses au système immunitaire par la régulation négative du CD70, augmente le potentiel métastatique et favorise l'angiogenèse par la stimulation de la production du CD44 et du VEGF (305). D'un autre côté, IL-18 exerce un effet anti-tumoral par l'induction d'une réponse immunitaire vis-à-vis des cellules cancéreuses, notamment dans le contexte du cancer du côlon (181,187,188,192,262). En plus de ces résultats obtenus chez des modèles murins, un essai clinique de phase II a montré que l'injection d'IL-18 est bien tolérée et induit, à elle-seule, des effets anti-tumoraux lorsqu'elle est utilisée chez des patients ayant un cancer de stade avancé (306).

Bien que la majorité des études se soient focalisées sur les lymphocytes et les cellules NK dans ce contexte, l'implication des éosinophiles peut être envisagée puisqu'ils expriment l'IL-18R et répondent à cette cytokine (161,162). Dans ce travail, nous avons pu mettre en évidence l'implication de l'IL-18 dans la cytotoxicité anti-tumorale des éosinophiles vis-à-vis des Colo-205, notamment en favorisant le contact entre ces deux types cellulaires. Cependant, de nombreuses questions restent en suspens.

#### **- Immuno-régulation par l'IL-18**

L'IL-18 est une cytokine immuno-régulatrice, capable d'induire la libération de cytokines Th1, Th2 ou Th17 selon contexte cytokinique (137,142). En effet, en présence d'IL-12, l'IL-18 stimule la production d'IFN $\gamma$  et, en présence d'IL-2, elle conduit à la production d'IL-4 et d'IL-13 (138,148). Cette cytokine augmente également le potentiel cytotoxique des lymphocytes et cellules NK par l'augmentation de l'expression de FasL (156,157).

Nous avons montré que l'IL-18, seule ou associée à l'IL-12, activent les éosinophiles qui libèrent de l'IFN $\gamma$  et sur-exprime FasL. Il serait donc d'intéressant d'évaluer l'implication de ces molécules dans le modèle de cytotoxicité. Plusieurs études ont également évoqué une action anti-tumorale d'une réponse de type Th2 dépendante des éosinophiles, notamment via libération des protéines cationiques (199,200,203). De la même manière, nous pourrions tester implication d'un environnement cytokinique de type Th2 sur la cytotoxicité des éosinophiles.

### - **Rôle des inflammasomes dans le cancer du côlon**

L'IL-18 est produite sous forme de pro-IL-18 inactive, son clivage permettant sa libération sous forme active. Cette activation se fait principalement sous la dépendance d'un complexe multi-protéique, l'inflammasome (118). Celui-ci est composé de la caspase-1, de l'ASC et d'un NLR. Il existe donc plusieurs types d'inflammasome selon le NLR qui le compose. L'action de l'IL-18 dans le côlon est donc intimement liée à celle des inflammasomes. Ceux-ci semblent avoir un rôle protecteur dans ce type de cancer puisque les souris *Casp1*<sup>-/-</sup> et *Asc*<sup>-/-</sup> développent plus de tumeurs coliques que les souris WT (186–188).

#### *NLRP3 inflammasome*

Cet inflammasome est le plus étudié dans le cancer du côlon et semble avoir un effet protecteur (307,308). En effet, l'absence génétique du NLRP3 augmente la susceptibilité à développer un cancer dans un modèle d'AOM + DSS (187,188). Le mécanisme par lequel cet inflammasome régule la cancérogénèse semble dépendant de l'IL-18 (187) et plus particulièrement de l'IL-18 libérée par les cellules hématopoïétiques (188). Bien que les éosinophiles expriment cet inflammasome, la détermination de son implication dans leur cytotoxicité est rendue difficile par le fait qu'il n'existe pas d'inhibiteur spécifique.

#### *Autres inflammasomes*

L'implication d'autres inflammasomes dans le cancer du côlon a également été étudiée avec les mêmes conclusions. En effet une augmentation du nombre de tumeurs coliques ont été observées dans des souris *Nlrp6*<sup>-/-</sup> (309), *Nlrp4*<sup>-/-</sup> (310) ou *Nlrp12*<sup>-/-</sup> (311).

### - **Source d'IL-18 : éosinophiles ou colo-205 ?**

Une autre question à résoudre est la détermination de la source cellulaire de l'IL-18. En effet, nous avons pu mettre en évidence que les éosinophiles humains et les Colo-205 expriment l'ARNm de l'IL-18. La protéine est, quant à elle, seulement retrouvée dans les éosinophiles. Cependant, ces phénotypes ont été effectués en conditions basales. L'expression protéique de l'IL-18 par les Colo-205 pourrait nécessiter une stimulation préalable.

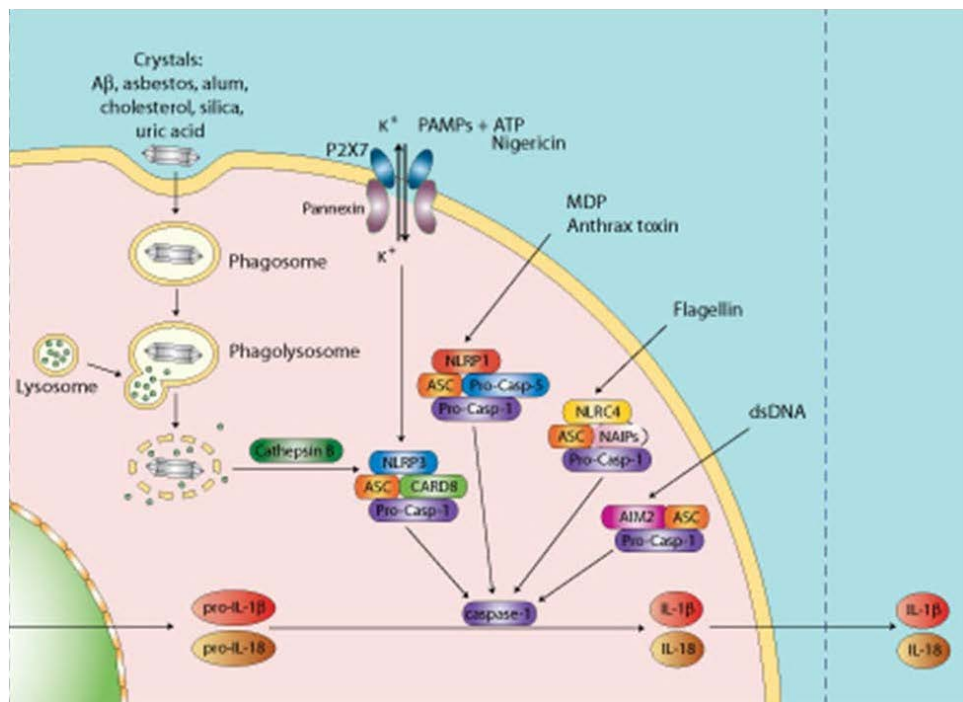


Cependant, une étude s'intéressant à l'expression de l'IL-18 et de la caspase-1 sur des lignées cellulaires de carcinome du côlon (LoVo, LS-174T, Caco-2, SW480 et SW620) a montré que si 4 de ces 5 lignées cellulaires exprimaient l'IL-18, aucune n'exprimait la caspase-1. Concernant les Colo-205, nous avons fait les mêmes constatations. La présence de tous les composants de l'inflammasome dans les éosinophiles, suggèrent qu'ils pourraient être la source de la libération de la forme active de l'IL-18. Cependant, on ne peut éliminer, pour le moment, la possibilité d'un clivage intracellulaire indépendant de la caspase-1 ou un clivage extracellulaire de cette cytokine, mécanismes décrits dans la littérature (119,122,123).

- **Molécules et récepteurs conduisant à la libération d'IL-18**

Le clivage de l'IL-18 nécessite la formation de l'inflammasome se produisant après activation cellulaire par différents ligands. Tous les inflammasomes sont activés par des signaux infectieux. Cependant, seul l'inflammasome NLRP3 est activable par des signaux de dangers endogènes ou environnementaux (DAMPs), tels que l'ATP ou l'acide urique, libérés en cas de nécrose cellulaire (Fig. 33) (312). Ces médiateurs seraient donc particulièrement intéressants à tester.

L'activation du NLRP3 par l'acide urique se fait après déstabilisation du phagolysosome formé après phagocytose de ces cristaux. Les éosinophiles sont capables d'internaliser ces molécules (313) induisant ensuite la libération de nombreuses cytokines, des protéines cationiques et des « traps » (313,314). L'ATP extracellulaire agit quant à lui par efflux de potassium lorsqu'il se lie au  $P_2X_7$ , canal échangeur d'ions (315). Nous avons pu détecter ce récepteur à la membrane des éosinophiles, par cytométrie en flux.



**Figure 33 : Activation des inflammasomes**

Figure importée de : <http://www.invivogen.com/review-inflammasome>

### **Point 5 : éosinophiles en thérapie anti-cancéreuse**

#### **- Protéines cationiques : molécules thérapeutiques ?**

Les thérapies conventionnelles anti-cancéreuses utilisent souvent des composés exogènes pouvant être très immunogènes. L'ECP et l'EDN sont des molécules endogènes, donc moins immunogènes, et naturellement cytotoxiques. On pourrait imaginer leur utilisation dans les thérapies anti-tumorales. L'un des premiers problèmes concerne la sélectivité ou l'adressage de ces protéines. Pour pallier à cela, il serait possible de coupler des protéines avec des molécules reconnaissant les récepteurs exprimés sélectivement par les cellules tumorales. Cette stratégie a été évaluée *in vitro*, avec des résultats prometteurs, en conjuguant l'ECP et de l'EGF (Epidermal Growth Factor), sur des cellules de cancer du sein sur-exprimant l'EGFR (316).

Concernant l'EDN, il existe une EDN modifiée chez la femme enceinte, appelée (-4) EDN, puisqu'elle comporte une extension de 4 acides-aminés (317). Celle-ci s'est révélée cytotoxique vis-à-vis des cellules du sarcome de Kaposi (318). Ainsi, la synthèse un peptide mimant cette EDN modifiée pourrait être une nouvelle piste pour la recherche de nouvelles molécules anti-cancéreuses (319,320).

- Place des éosinophiles dans l'Allergo-Oncologie

Les éosinophiles pourraient être une des cellules effectrices majeures dans le mécanisme d'action de nouveaux anticorps monoclonaux de la classe des IgE ciblant les antigènes spécifiques des tumeurs. Bien qu'actuellement, il n'existe pas encore d'anticorps de cette classe sur le marché, ils présenteraient de nombreux avantages, décrits précédemment dans le paragraphe introductif III.2.4.3 (p.53). En effet, leur localisation principalement tissulaire, leur forte affinité pour leur récepteur ainsi l'absence (ou dans tous les cas, non décrite) de récepteurs inhibiteurs en font une potentielle classe thérapeutique séduisante (254,255). De plus, il a été démontré dans des études *in vitro* et *in vivo*, leur supériorité vis-à-vis des tumeurs comparées aux anticorps de la classe des IgG (256,257).

Ainsi, une collaboration avec l'équipe du Pr. Manuel Penichet (UCLA, USA) a été mise en place afin de tester l'implication des éosinophiles humains dans l'ADCC médiée par les IgE, par l'utilisation d'un anticorps anti-HER2/neu de la classe des IgE. Cet anticorps, créé dans leur laboratoire, a déjà montré son efficacité dans des modèles *in vivo* comparé au trastuzumab (anti-HER2/neu IgG1) (257). Dans un modèle *in vitro*, nous allons tester l'effet de cet anticorps sur la cytotoxicité des éosinophiles, issus de donneurs normaux ou allergiques, vis-à-vis de lignées cellulaires sur-exprimant le proto-oncogène HER2/neu, les SK-BR3 (carcinome du sein) et les Caco-2 (carcinome du côlon).

## CONCLUSION

Les éosinophiles, dont la fonction a longtemps été restreinte à une activité effectrice dans les infections parasitaires ou dans les maladies allergiques, sont en fait capables de jouer également un rôle dans la défense anti-tumorale et l'immunosurveillance. En effet, leur localisation tissulaire, leur recrutement au sein de nombreuses tumeurs ainsi que leur potentiel cytotoxique reconnu, sont autant d'arguments qui supportent le rôle effecteur de ces cellules dans l'immunité anti-tumorale. De par leur capacité à participer aussi bien aux réponses immunitaires innées qu'adaptatives, les éosinophiles pourraient jouer un rôle central dans tous les stades de la pathologie, des plus précoces aux plus tardifs. Tout d'abord, ils sont capables d'intégrer les signaux de dangers libérés par les cellules nécrotiques et d'y répondre rapidement et sélectivement. Ils sont ensuite capables de recruter et d'activer les lymphocytes T et B par leur fonction de cellules présentatrices d'antigène et peuvent, en retour être activés par ceux-ci afin de participer à l'immunité adaptative en polarisant la fonction immunitaire. Enfin ils peuvent également participer à la clairance des débris cellulaires au niveau des tissus lésés. Il en est de même avec l'activation de leur fonction cytotoxique directe, due à leurs grands nombre de médiateurs. Celle-ci peut être induite par les alarmines, mais également par un mécanisme d'ADCC.

Au cours de ce travail, nous avons mis en évidence l'implication de l'IL-18 dans la cytotoxicité anti-tumorale des éosinophiles vis-à-vis d'une lignée cellulaire humaine de carcinome du côlon, les Colo-205. Cette activité nécessite un contact entre les cellules effectrices et les cellules cibles, impliquant LFA-1 sur les éosinophiles et ICAM-1 sur les Colo-205. L'IL-18 intervient dans ce phénomène en régulant positivement ces molécules d'adhérence et donc en favorisant la cytotoxicité des éosinophiles, dépendante de ce contact. Bien que la relevance *in vivo* de ces nouvelles capacités pour les éosinophiles nécessite d'être démontrée ces résultats ouvrent de nouvelles perspectives dans la participation des éosinophiles à l'immunité anti-tumorale.

La détermination des mécanismes impliqués dans un type de cancer donné pourrait conduire à considérer de nouvelles perspectives thérapeutiques, notamment en induisant l'activation des éosinophiles par l'utilisation d'agonistes de leurs récepteurs par exemple. A moins long terme, il serait également envisageable d'utiliser des anticorps monoclonaux de la

classe des IgE afin d'activer les cellules ayant le FcεR à leur surface, dont et principalement les éosinophiles.

Les polynucléaires éosinophiles sont donc des cellules tout à fait particulières, par leurs fonctions effectrices et régulatrices dans des situations d'homéostasie et de pathologies. Encore aujourd'hui, la grande majorité des études considère les éosinophiles comme des cellules purement néfastes. Cependant, à la vue des résultats présentés dans cette thèse, il est nécessaire de reconnaître leurs rôles bénéfiques, non seulement dans l'immunité antiparasitaire, mais également dans l'immunité anti-tumorale.

## BIBLIOGRAPHIE

1. Graf T. Differentiation plasticity of hematopoietic cells. *Blood*. 2002 May 1;99(9):3089–101.
2. Rosenbauer F, Tenen DG. Transcription factors in myeloid development: balancing differentiation with transformation. *Nat Rev Immunol*. 2007 Feb;7(2):105–17.
3. Lee JJ, Rosenberg HF. *Eosinophils in Health and Disease*. Elsevier; 2013. 679 p.
4. McNagny K, Graf T. Making Eosinophils Through Subtle Shifts in Transcription Factor Expression. *J Exp Med*. 2002 Jun 3;195(11):F43–7.
5. Gombart AF, Kwok SH, Anderson KL, Yamaguchi Y, Torbett BE, Koeffler HP. Regulation of neutrophil and eosinophil secondary granule gene expression by transcription factors C/EBP $\epsilon$  and PU.1. *Blood*. 2003 Apr 15;101(8):3265–73.
6. Bedi R, Du J, Sharma AK, Gomes I, Ackerman SJ. Human C/EBP- $\epsilon$  activator and repressor isoforms differentially reprogram myeloid lineage commitment and differentiation. *Blood*. 2009 Jan 8;113(2):317–27.
7. Dent LA, Strath M, Mellor AL, Sanderson CJ. Eosinophilia in transgenic mice expressing interleukin 5. *J Exp Med*. 1990 Nov 1;172(5):1425–31.
8. Kopf M, Brombacher F, Hodgkin PD, Ramsay AJ, Milbourne EA, Dai WJ, et al. IL-5-deficient mice have a developmental defect in CD5<sup>+</sup> B-1 cells and lack eosinophilia but have normal antibody and cytotoxic T cell responses. *Immunity*. 1996 Jan;4(1):15–24.
9. Mori Y, Iwasaki H, Kohno K, Yoshimoto G, Kikushige Y, Okeda A, et al. Identification of the human eosinophil lineage-committed progenitor: revision of phenotypic definition of the human common myeloid progenitor. *J Exp Med*. 2009 Jan 16;206(1):183–93.
10. Melo RCN, Liu L, Xenakis JJ, Spencer LA. Eosinophil-derived cytokines in health and disease: unraveling novel mechanisms of selective secretion. *Allergy*. 2013 Mar 1;68(3):274–84.
11. Rothenberg ME, Owen WF Jr, Silberstein DS, Soberman RJ, Austen KF, Stevens RL. Eosinophils cocultured with endothelial cells have increased survival and functional properties. *Science*. 1987 Aug 7;237(4815):645–7.
12. Mishra A, Hogan SP, Brandt EB, Rothenberg ME. Peyer's patch eosinophils: identification, characterization, and regulation by mucosal allergen exposure, interleukin-5, and eotaxin. *Blood*. 2000 Aug 15;96(4):1538–44.
13. Millard CJ, Ludeman JP, Canals M, Bridgford JL, Hinds MG, Clayton DJ, et al. Structural Basis of Receptor Sulfotyrosine Recognition by a CC Chemokine: The N-Terminal Region of CCR3 Bound to CCL11/Eotaxin-1. *Struct Lond Engl* 1993. 2014 Oct 23;22(11):1571–81.

14. Loetscher P, Pellegrino A, Gong J-H, Mattioli I, Loetscher M, Bardi G, et al. The Ligands of CXC Chemokine Receptor 3, I-TAC, Mig, and IP10, Are Natural Antagonists for CCR3. *J Biol Chem*. 2001 Feb 2;276(5):2986–91.
15. Weng Y, Siciliano SJ, Waldburger KE, Sirotina-Meisher A, Staruch MJ, Daugherty BL, et al. Binding and functional properties of recombinant and endogenous CXCR3 chemokine receptors. *J Biol Chem*. 1998 Jul 17;273(29):18288–91.
16. Mishra A, Hogan SP, Lee JJ, Foster PS, Rothenberg ME. Fundamental signals that regulate eosinophil homing to the gastrointestinal tract. *J Clin Invest*. 1999 Jun 15;103(12):1719–27.
17. Rothenberg ME, Hogan SP. The Eosinophil. *Annu Rev Immunol*. 2006;24(1):147–74.
18. Rothenberg ME, MacLean JA, Pearlman E, Luster AD, Leder P. Targeted Disruption of the Chemokine Eotaxin Partially Reduces Antigen-induced Tissue Eosinophilia. *J Exp Med*. 1997 Feb 17;185(4):785–90.
19. Kitaura M, Suzuki N, Imai T, Takagi S, Suzuki R, Nakajima T, et al. Molecular Cloning of a Novel Human CC Chemokine (Eotaxin-3) That Is a Functional Ligand of CC Chemokine Receptor 3. *J Biol Chem*. 1999 Sep 24;274(39):27975–80.
20. Lee JJ, Jacobsen EA, McGarry MP, Schleimer RP, Lee NA. Eosinophils in health and disease: the LIAR hypothesis. *Clin Exp Allergy*. 2010 Apr 1;40(4):563–75.
21. Svensson-Frej M. Immunobiology of Intestinal Eosinophils – A Dogma in the Changing? *J Innate Immun*. 2011;3(6):565–76.
22. Baumann A, Gönnerwein S, Bischoff SC, Sherman H, Chapnik N, Froy O, et al. The circadian clock is functional in eosinophils and mast cells. *Immunology*. 2013 Dec;140(4):465–74.
23. Wu D, Molofsky AB, Liang H-E, Ricardo-Gonzalez RR, Jouihan HA, Bando JK, et al. Eosinophils Sustain Adipose Alternatively Activated Macrophages Associated with Glucose Homeostasis. *Science*. 2011 Apr 8;332(6026):243–7.
24. Nussbaum JC, Van Dyken SJ, von Moltke J, Cheng LE, Mohapatra A, Molofsky AB, et al. Type 2 innate lymphoid cells control eosinophil homeostasis. *Nature*. 2013 Oct 10;502(7470):245–8.
25. Forbes E, Hulett M, Ahrens R, Wagner N, Smart V, Matthaei KI, et al. ICAM-1-dependent pathways regulate colonic eosinophilic inflammation. *J Leukoc Biol*. 2006 Aug;80(2):330–41.
26. Kita H. Eosinophils: multifaceted biological properties and roles in health and disease. *Immunol Rev*. 2011 Jul 1;242(1):161–77.
27. Stenfeldt A-L, Wennerås C. Danger signals derived from stressed and necrotic epithelial cells activate human eosinophils. *Immunology*. 2004;112(4):605–14.

28. Wong CK, Cheung PFY, Ip WK, Lam CWK. Intracellular Signaling Mechanisms Regulating Toll-Like Receptor–Mediated Activation of Eosinophils. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2007 Jul;37(1):85–96.
29. Driss V, Legrand F, Loiseau S, Capron M. L'éosinophile : nouvel acteur de la réponse immunitaire innée ? *médecine/sciences*. 2010 Jun;26(6-7):621–6.
30. Nagase H, Okugawa S, Ota Y, Yamaguchi M, Tomizawa H, Matsushima K, et al. Expression and Function of Toll-Like Receptors in Eosinophils: Activation by Toll-Like Receptor 7 Ligand. *J Immunol*. 2003 Oct 15;171(8):3977–82.
31. Driss V, Legrand F, Hermann E, Loiseau S, Guerardel Y, Kremer L, et al. TLR2-dependent eosinophil interactions with mycobacteria: role of  $\alpha$ -defensins. *Blood*. 2009 Apr 2;113(14):3235–44.
32. Wada K, Matsuwaki Y, Yoon J, Benson LM, Checkel JL, Bingemann TA, et al. Inflammatory responses of human eosinophils to cockroach are mediated through protease-dependent pathways. *J Allergy Clin Immunol*. 2010 Jul;126(1):169–72.e2.
33. Matsuwaki Y, Wada K, White TA, Benson LM, Charlesworth MC, Checkel JL, et al. Recognition of Fungal Protease Activities Induces Cellular Activation and Eosinophil-Derived Neurotoxin Release in Human Eosinophils. *J Immunol*. 2009 Nov 15;183(10):6708–16.
34. Bolton SJ, McNulty CA, Thomas RJ, Hewitt CRA, Wardlaw AJ. Expression of and functional responses to protease-activated receptors on human eosinophils. *J Leukoc Biol*. 2003 Jul 1;74(1):60–8.
35. Fischer E, Capron M, Prin L, Kusnierz JP, Kazatchkine MD. Human eosinophils express CR1 and CR3 complement receptors for cleavage fragments of C3. *Cell Immunol*. 1986 Feb;97(2):297–306.
36. Legrand F, Driss V, Woerly G, Loiseau S, Hermann E, Fournié J-J, et al. A Functional  $\gamma\delta$ TCR/CD3 Complex Distinct from  $\gamma\delta$ T Cells Is Expressed by Human Eosinophils. *PLoS ONE*. 2009 Jun 17;4(6):e5926.
37. Simon D, Simon H-U, Yousefi S. Extracellular DNA traps in allergic, infectious, and autoimmune diseases. *Allergy*. 2013 Apr 1;68(4):409–16.
38. Yousefi S, Gold JA, Andina N, Lee JJ, Kelly AM, Kozlowski E, et al. Catapult-like release of mitochondrial DNA by eosinophils contributes to antibacterial defense. *Nat Med*. 2008 Sep;14(9):949–53.
39. Morshed M, Yousefi S, Stöckle C, Simon H-U, Simon D. Thymic stromal lymphopoietin stimulates the formation of eosinophil extracellular traps. *Allergy*. 2012 Sep 1;67(9):1127–37.
40. Herrmann M. Monosodium urate crystals induce extracellular DNA traps in neutrophils, eosinophils, and basophils but not in mononuclear cells. *Front Inflamm*. 2012;3:277.



41. Truong M-J, Gruart V, Liu F-T, Prin L, Capron A, Capron M. IgE-binding molecules (Mac-2/eBP) expressed by human eosinophils. Implication in IgE-dependent eosinophil cytotoxicity. *Eur J Immunol*. 1993 Dec 1;23(12):3230–5.
42. Akuthota P, Wang H, Weller PF. Eosinophils as antigen-presenting cells in allergic upper airway disease. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2010 Feb;10(1):14–9.
43. Shi HZ, Humbles A, Gerard C, Jin Z, Weller PF. Lymph node trafficking and antigen presentation by endobronchial eosinophils. *J Clin Invest*. 2000 Apr;105(7):945–53.
44. Padigel UM, Hess JA, Lee JJ, Lok JB, Nolan TJ, Schad GA, et al. Eosinophils act as antigen-presenting cells to induce immunity to *Strongyloides stercoralis* in mice. *J Infect Dis*. 2007 Dec 15;196(12):1844–51.
45. Plager DA, Loegering DA, Checkel JL, Tang J, Kephart GM, Caffes PL, et al. Major Basic Protein Homolog (MBP2): A Specific Human Eosinophil Marker. *J Immunol*. 2006 Nov 15;177(10):7340–5.
46. Thomas LL, Kubo H, Loegering DJ, Spillard K, Weaver AJ, McCormick DJ, et al. Peptide-based analysis of amino acid sequences important to the biological activity of eosinophil granule major basic protein. *Immunol Lett*. 2001 Oct 1;78(3):175–81.
47. Kita H, Abu-Ghazaleh RI, Sur S, Gleich GJ. Eosinophil major basic protein induces degranulation and IL-8 production by human eosinophils. *J Immunol*. 1995 May 1;154(9):4749–58.
48. Jacoby DB, Gleich GJ, Fryer AD. Human eosinophil major basic protein is an endogenous allosteric antagonist at the inhibitory muscarinic M2 receptor. *J Clin Invest*. 1993 Apr 1;91(4):1314–8.
49. Pégorier S, Wagner LA, Gleich GJ, Pretolani M. Eosinophil-Derived Cationic Proteins Activate the Synthesis of Remodeling Factors by Airway Epithelial Cells. *J Immunol*. 2006 Oct 1;177(7):4861–9.
50. Rosenberg HF. RNase A ribonucleases and host defense: an evolving story. *J Leukoc Biol*. 2008 May 1;83(5):1079–87.
51. Navarro S, Aleu J, Jiménez M, Boix E, Cuchillo CM, Nogués MV. The cytotoxicity of eosinophil cationic protein/ribonuclease 3 on eukaryotic cell lines takes place through its aggregation on the cell membrane. *Cell Mol Life Sci*. 2008 Jan 1;65(2):324–37.
52. Jönsson U-B, Byström J, Stålenheim G, Venge P. Polymorphism of the eosinophil cationic protein-gene is related to the expression of allergic symptoms. *Clin Exp Allergy*. 2002;32(7):1092–5.
53. Jönsson U-B, Byström J, Stålenheim G, Venge P. A (G→C) transversion in the 3' UTR of the human ECP (eosinophil cationic protein) gene correlates to the cellular content of ECP. *J Leukoc Biol*. 2006 Apr 1;79(4):846–51.
54. Eriksson J, Woschnagg C, Fernvik E, Venge P. A SELDI-TOF MS study of the genetic and post-translational molecular heterogeneity of eosinophil cationic protein. *J Leukoc Biol*. 2007 Dec 1;82(6):1491–500.

55. Yang D, Chen Q, Rosenberg HF, Rybak SM, Newton DL, Wang ZY, et al. Human Ribonuclease A Superfamily Members, Eosinophil-Derived Neurotoxin and Pancreatic Ribonuclease, Induce Dendritic Cell Maturation and Activation. *J Immunol*. 2004 Nov 15;173(10):6134–42.
56. Yang D, Chen Q, Su SB, Zhang P, Kurosaka K, Caspi RR, et al. Eosinophil-derived neurotoxin acts as an alarmin to activate the TLR2–MyD88 signal pathway in dendritic cells and enhances Th2 immune responses. *J Exp Med*. 2008 Jan 21;205(1):79–90.
57. Ulrich M, Petre A, Youhnovski N, Prömm F, Schirle M, Schumm M, et al. Post-translational Tyrosine Nitration of Eosinophil Granule Toxins Mediated by Eosinophil Peroxidase. *J Biol Chem*. 2008 Oct 17;283(42):28629–40.
58. Acharya KR, Ackerman SJ. Eosinophil granule proteins: form and function. *J Biol Chem*. 2014 Jun 20;289(25):17406–15.
59. Capron M, Tomassini M, Torpier G, Kusnierz JP, MacDonald S, Capron A. Selectivity of mediators released by eosinophils. *Int Arch Allergy Appl Immunol*. 1989;88(1-2):54–8.
60. Tomassini M, Tsicopoulos A, Tai PC, Gruart V, Tonnel AB, Prin L, et al. Release of granule proteins by eosinophils from allergic and nonallergic patients with eosinophilia on immunoglobulin-dependent activation. *J Allergy Clin Immunol*. 1991 Sep;88(3 Pt 1):365–75.
61. Logan MR, Lacy P, Bablitz B, Moqbel R. Expression of eosinophil target SNAREs as potential cognate receptors for vesicle-associated membrane protein-2 in exocytosis. *J Allergy Clin Immunol*. 2002 Feb;109(2):299–306.
62. Woerly G, Roger N, Loiseau S, Dombrowicz D, Capron A, Capron M. Expression of Cd28 and Cd86 by Human Eosinophils and Role in the Secretion of Type 1 Cytokines (Interleukin 2 and Interferon  $\gamma$ ) Inhibition by Immunoglobulin a Complexes. *J Exp Med*. 1999 Aug 16;190(4):487–96.
63. Kahn J-E, Dutoit-Lefevre V, Duban-Deweere S, Chafey P, Pottiez G, Lefranc D, et al. Comparative Proteomic Analysis of Blood Eosinophils Reveals Redox Signaling Modifications in Patients with FIP1L1-PDGFR $\alpha$ -Associated Chronic Eosinophilic Leukemia. *J Proteome Res*. 2011 Apr 1;10(4):1468–80.
64. Capron M, Bazin H, Joseph M, Capron A. Evidence for IgE-dependent cytotoxicity by rat eosinophils. *J Immunol*. 1981 May 1;126(5):1764–8.
65. SoussiGounni A, Lamkhioued B, Ochiai K, Tanaka Y, Delaporte E, Capron A, et al. High-affinity IgE receptor on eosinophils is involved in defence against parasites. *Nature*. 1994 Jan 13;367(6459):183–6.
66. Shamri R, Xenakis JJ, Spencer LA. Eosinophils in innate immunity: an evolving story. *Cell Tissue Res*. 2011 Jan 1;343(1):57–83.
67. Grezel D, Capron M, Grzych JM, Fontaine J, Lecocq JP, Capron A. Protective immunity induced in rat schistosomiasis by a single dose of the Sm28GST recombinant antigen:

- effector mechanisms involving IgE and IgA antibodies. *Eur J Immunol*. 1993 Feb;23(2):454–60.
68. Kuroki M, Shirasu N. Novel treatment strategies for cancer and their tumor-targeting approaches using antibodies against tumor-associated antigens. *Anticancer Res*. 2014 Aug;34(8):4481–8.
  69. Woerly G, Lacy P, Younes AB, Roger N, Loiseau S, Moqbel R, et al. Human eosinophils express and release IL-13 following CD28-dependent activation. *J Leukoc Biol*. 2002 Oct 1;72(4):769–79.
  70. Lacy P, Levi-Schaffer F, Mahmudi-Azer S, Bablitz B, Hagen SC, Velazquez J, et al. Intracellular Localization of Interleukin-6 in Eosinophils From Atopic Asthmatics and Effects of Interferon  $\gamma$ . *Blood*. 1998 Apr 1;91(7):2508–16.
  71. Wang H-B, Ghiran I, Matthaei K, Weller PF. Airway Eosinophils: Allergic Inflammation Recruited Professional Antigen-Presenting Cells. *J Immunol*. 2007 Dec 1;179(11):7585–92.
  72. Jacobsen EA, Zellner KR, Colbert D, Lee NA, Lee JJ. Eosinophils regulate dendritic cells and Th2 pulmonary immune responses following allergen provocation. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2011 Dec 1;187(11):6059–68.
  73. Chu VT, Fröhlich A, Steinhauser G, Scheel T, Roch T, Fillatreau S, et al. Eosinophils are required for the maintenance of plasma cells in the bone marrow. *Nat Immunol*. 2011 Feb;12(2):151–9.
  74. Rosenberg HF, Dyer KD, Foster PS. Eosinophils: changing perspectives in health and disease. *Nat Rev Immunol*. 2013 Jan;13(1):9–22.
  75. Serhan CN, Gotlinger K, Hong S, Lu Y, Siegelman J, Baer T, et al. Anti-Inflammatory Actions of Neuroprotectin D1/Protectin D1 and Its Natural Stereoisomers: Assignments of Dihydroxy-Containing Docosatrienes. *J Immunol*. 2006 Feb 1;176(3):1848–59.
  76. Jacobsen EA, Helmers RA, Lee JJ, Lee NA. The expanding role(s) of eosinophils in health and disease. *Blood*. 2012 Nov 8;120(19):3882–90.
  77. Kay AB. The role of eosinophils in the pathogenesis of asthma. *Trends Mol Med*. 2005 Apr;11(4):148–52.
  78. Leckie MJ, Brinke A ten, Khan J, Diamant Z, O'Connor BJ, Walls CM, et al. Effects of an interleukin-5 blocking monoclonal antibody on eosinophils, airway hyper-responsiveness, and the late asthmatic response. *The Lancet*. 2000 Dec 30;356(9248):2144–8.
  79. Menzies-Gow A, Flood-Page P, Sehmi R, Burman J, Hamid Q, Robinson DS, et al. Anti-IL-5 (mepolizumab) therapy induces bone marrow eosinophil maturational arrest and decreases eosinophil progenitors in the bronchial mucosa of atopic asthmatics. *J Allergy Clin Immunol*. 2003 Apr;111(4):714–9.

80. Castro M, Mathur S, Hargreave F, Boulet L-P, Xie F, Young J, et al. Reslizumab for Poorly Controlled, Eosinophilic Asthma: A Randomized, Placebo-controlled Study. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011 Nov 15;184(10):1125–32.
81. Pavord ID, Korn S, Howarth P, Bleecker ER, Buhl R, Keene ON, et al. Mepolizumab for severe eosinophilic asthma (DREAM): a multicentre, double-blind, placebo-controlled trial. *The Lancet*. 2012 Aug 24;380(9842):651–9.
82. Gotlib J. World Health Organization-defined eosinophilic disorders: 2014 update on diagnosis, risk stratification, and management. *Am J Hematol*. 2014 Mar 1;89(3):325–37.
83. Cools J, DeAngelo DJ, Gotlib J, Stover EH, Legare RD, Cortes J, et al. A Tyrosine Kinase Created by Fusion of the PDGFRA and FIP1L1 Genes as a Therapeutic Target of Imatinib in Idiopathic Hypereosinophilic Syndrome. *N Engl J Med*. 2003 Mar 27;348(13):1201–14.
84. Legrand F, Renneville A, Macintyre E, Mastrilli S, Ackermann F, Cayuela JM, et al. The Spectrum of FIP1L1-PDGFRΑ-Associated Chronic Eosinophilic Leukemia: New Insights Based on a Survey of 44 Cases. *Medicine (Baltimore)*. 2013 Aug 26;
85. Roufosse FE, Kahn J-E, Gleich GJ, Schwartz LB, Singh AD, Rosenwasser LJ, et al. Long-term safety of mepolizumab for the treatment of hypereosinophilic syndromes. *J Allergy Clin Immunol*. 2013 Feb;131(2):461–7.e1–5.
86. Lefèvre G, Copin M-C, Staumont-Sallé D, Avenel-Audran M, Aubert H, Taieb A, et al. The Lymphoid Variant of Hypereosinophilic Syndrome: Study of 21 Patients With CD3-CD4+ Aberrant T-Cell Phenotype. *Medicine (Baltimore)*. 2014 Oct;93(17):255–66.
87. Hogan SP, Waddell A, Fulkerson PC. Eosinophils in infection and intestinal immunity. *Curr Opin Gastroenterol*. 2013 Jan;29(1):7–14.
88. Stasikowska-Kanicka O, Danilewicz M, Głowacka A, Wągrowaska-Danilewicz M. Mast cells and eosinophils are involved in activation of ulcerative colitis. *Adv Med Sci*. 2012;57(2):230–6.
89. Lampinen M, Rönnblom A, Amin K, Kristjansson G, Rorsman F, Sangfelt P, et al. Eosinophil granulocytes are activated during the remission phase of ulcerative colitis. *Gut*. 2005 Dec;54(12):1714–20.
90. Ahrens R, Waddell A, Seidu L, Blanchard C, Carey R, Forbes E, et al. Intestinal Macrophage/Epithelial Cell-Derived CCL11/Eotaxin-1 Mediates Eosinophil Recruitment and Function in Pediatric Ulcerative Colitis. *J Immunol*. 2008 Nov 15;181(10):7390–9.
91. Vieira AT, Fagundes CT, Alessandri AL, Castor MGM, Guabiraba R, Borges VO, et al. Treatment with a Novel Chemokine-Binding Protein or Eosinophil Lineage-Ablation Protects Mice from Experimental Colitis. *Am J Pathol*. 2009 Dec;175(6):2382–91.
92. Masterson JC, McNamee EN, Fillon SA, Hosford L, Harris R, Fernando SD, et al. Eosinophil-mediated signalling attenuates inflammatory responses in experimental colitis. *Gut*. 2014 Sep 10;gutjnl – 2014–306998.

93. Ma BW, Bokulich NA, Castillo PA, Kananurak A, Underwood MA, Mills DA, et al. Routine habitat change: a source of unrecognized transient alteration of intestinal microbiota in laboratory mice. *PloS One*. 2012;7(10):e47416.
94. Gatault S, Legrand F, Delbeke M, Loiseau S, Capron M. Involvement of eosinophils in the anti-tumor response. *Cancer Immunol Immunother*. 2012 Sep 1;61(9):1527–34.
95. Dent LA, Strath M, Mellor AL, Sanderson CJ. Eosinophilia in transgenic mice expressing interleukin 5. *J Exp Med*. 1990 Nov 1;172(5):1425–31.
96. Ochkur SI, Jacobsen EA, Protheroe CA, Biechele TL, Pero RS, McGarry MP, et al. Coexpression of IL-5 and eotaxin-2 in mice creates an eosinophil-dependent model of respiratory inflammation with characteristics of severe asthma. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2007 Jun 15;178(12):7879–89.
97. Yu C, Cantor AB, Yang H, Browne C, Wells RA, Fujiwara Y, et al. Targeted Deletion of a High-Affinity GATA-binding Site in the GATA-1 Promoter Leads to Selective Loss of the Eosinophil Lineage In Vivo. *J Exp Med*. 2002 Jun 3;195(11):1387–95.
98. Doyle AD, Jacobsen EA, Ochkur SI, McGarry MP, Shim KG, Nguyen DTC, et al. Expression of the secondary granule proteins major basic protein 1 (MBP-1) and eosinophil peroxidase (EPX) is required for eosinophilopoiesis in mice. *Blood*. 2013 Aug 1;122(5):781–90.
99. Lee JJ, Dimina D, Macias MP, Ochkur SI, McGarry MP, O'Neill KR, et al. Defining a Link with Asthma in Mice Congenitally Deficient in Eosinophils. *Science*. 2004 Sep 17;305(5691):1773–6.
100. Rothenberg ME, MacLean JA, Pearlman E, Luster AD, Leder P. Targeted disruption of the chemokine eotaxin partially reduces antigen-induced tissue eosinophilia. *J Exp Med*. 1997 Feb 17;185(4):785–90.
101. Pope SM, Fulkerson PC, Blanchard C, Akei HS, Nikolaidis NM, Zimmermann N, et al. Identification of a cooperative mechanism involving interleukin-13 and eotaxin-2 in experimental allergic lung inflammation. *J Biol Chem*. 2005 Apr 8;280(14):13952–61.
102. Humbles AA, Lu B, Friend DS, Okinaga S, Lora J, Al-Garawi A, et al. The murine CCR3 receptor regulates both the role of eosinophils and mast cells in allergen-induced airway inflammation and hyperresponsiveness. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Feb 5;99(3):1479–84.
103. Nakamura K, Okamura H, Wada M, Nagata K, Tamura T. Endotoxin-induced serum factor that stimulates gamma interferon production. *Infect Immun*. 1989 Feb 1;57(2):590–5.
104. Okamura H, Tsutsi H, Komatsu T, Yutsudo M, Hakura A, Tanimoto T, et al. Cloning of a new cytokine that induces IFN-gamma production by T cells. *Nature*. 1995 Nov 2;378(6552):88–91.
105. Puren AJ, Fantuzzi G, Dinarello CA. Gene expression, synthesis, and secretion of interleukin 18 and interleukin 1 $\beta$  are differentially regulated in human blood

- mononuclear cells and mouse spleen cells. *Proc Natl Acad Sci.* 1999 Mar 2;96(5):2256–61.
106. Nakanishi K, Yoshimoto T, Tsutsui H, Okamura H. Interleukin-18 is a unique cytokine that stimulates both Th1 and Th2 responses depending on its cytokine milieu. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2001 Mar;12(1):53–72.
  107. Ushio S, Namba M, Okura T, Hattori K, Nukada Y, Akita K, et al. Cloning of the cDNA for human IFN-gamma-inducing factor, expression in *Escherichia coli*, and studies on the biologic activities of the protein. *J Immunol.* 1996 Jun 1;156(11):4274–9.
  108. Stoll S, Jonuleit H, Schmitt E, Müller G, Yamauchi H, Kurimoto M, et al. Production of functional IL-18 by different subtypes of murine and human dendritic cells (DC): DC-derived IL-18 enhances IL-12-dependent Th1 development. *Eur J Immunol.* 1998 Oct 1;28(10):3231–9.
  109. Stoll S, Müller G, Kurimoto M, Saloga J, Tanimoto T, Yamauchi H, et al. Production of IL-18 (IFN-gamma-inducing factor) messenger RNA and functional protein by murine keratinocytes. *J Immunol.* 1997 Jul 1;159(1):298–302.
  110. Udagawa N, Horwood NJ, Elliott J, Mackay A, Owens J, Okamura H, et al. Interleukin-18 (Interferon- $\gamma$ -inducing Factor) Is Produced by Osteoblasts and Acts Via Granulocyte/Macrophage Colony-stimulating Factor and Not Via Interferon- $\gamma$  to Inhibit Osteoclast Formation. *J Exp Med.* 1997 Mar 17;185(6):1005–12.
  111. Takeuchi M, Nishizaki Y, Sano O, Ohta T, Ikeda M, Kurimoto M. Immunohistochemical and immuno-electron-microscopic detection of interferon-gamma-inducing factor (“interleukin-18”) in mouse intestinal epithelial cells. *Cell Tissue Res.* 1997 Sep;289(3):499–503.
  112. Fantuzzi G, Dinarello CA. Interleukin-18 and interleukin-1 beta: two cytokine substrates for ICE (caspase-1). *J Clin Immunol.* 1999 Jan;19(1):1–11.
  113. Tsutsui H, Kayagaki N, Kuida K, Nakano H, Hayashi N, Takeda K, et al. Caspase-1-Independent, Fas/Fas Ligand-Mediated IL-18 Secretion from Macrophages Causes Acute Liver Injury in Mice. *Immunity.* 1999 Sep 1;11(3):359–67.
  114. Kuida K, Lippke JA, Ku G, Harding MW, Livingston DJ, Su MS, et al. Altered cytokine export and apoptosis in mice deficient in interleukin-1 beta converting enzyme. *Science.* 1995 Mar 31;267(5206):2000–3.
  115. Martinon F, Burns K, Tschopp J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol Cell.* 2002 Aug;10(2):417–26.
  116. Ogura Y, Sutterwala FS, Flavell RA. The Inflammasome: First Line of the Immune Response to Cell Stress. *Cell.* 2006 Aug 25;126(4):659–62.
  117. Martinon F, Mayor A, Tschopp J. The Inflammasomes: Guardians of the Body. *Annu Rev Immunol.* 2009;27(1):229–65.

118. Lu A, Wu H. Structural mechanisms of inflammasome assembly. *FEBS J.* 2015;282(3):435–44.
119. Bossaller L, Chiang P-I, Schmidt-Lauber C, Ganesan S, Kaiser WJ, Rathinam VAK, et al. Cutting Edge: FAS (CD95) Mediates Noncanonical IL-1 $\beta$  and IL-18 Maturation via Caspase-8 in an RIP3-Independent Manner. *J Immunol.* 2012 Dec 15;189(12):5508–12.
120. Akita K, Ohtsuki T, Nukada Y, Tanimoto T, Namba M, Okura T, et al. Involvement of Caspase-1 and Caspase-3 in the Production and Processing of Mature Human Interleukin 18 in Monocytic THP.1 Cells. *J Biol Chem.* 1997 Oct 17;272(42):26595–603.
121. Omoto Y, Yamanaka K, Tokime K, Kitano S, Kakeda M, Akeda T, et al. Granzyme B is a novel interleukin-18 converting enzyme. *J Dermatol Sci.* 2010 Aug;59(2):129–35.
122. Sugawara S, Uehara A, Nochi T, Yamaguchi T, Ueda H, Sugiyama A, et al. Neutrophil Proteinase 3-Mediated Induction of Bioactive IL-18 Secretion by Human Oral Epithelial Cells. *J Immunol.* 2001 Dec 1;167(11):6568–75.
123. Omoto Y, Tokime K, Yamanaka K, Habe K, Morioka T, Kurokawa I, et al. Human mast cell chymase cleaves pro-IL-18 and generates a novel and biologically active IL-18 fragment. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2006 Dec 15;177(12):8315–9.
124. Banerjee S, Bond JS. Prointerleukin-18 is activated by meprin beta in vitro and in vivo in intestinal inflammation. *J Biol Chem.* 2008 Nov 14;283(46):31371–7.
125. Csernok E, Ernst M, Schmitt W, Bainton DF, Gross WL. Activated neutrophils express proteinase 3 on their plasma membrane in vitro and in vivo. *Clin Exp Immunol.* 1994 Feb;95(2):244–50.
126. Torigoe K, Ushio S, Okura T, Kobayashi S, Tanai M, Kunikata T, et al. Purification and Characterization of the Human Interleukin-18 Receptor. *J Biol Chem.* 1997 Oct 10;272(41):25737–42.
127. Weber A, Wasiliew P, Kracht M. Interleukin-1 (IL-1) Pathway. *Sci Signal.* 2010 Jan 19;3(105):cm1–cm1.
128. Lee J-K, Kim S-H, Lewis EC, Azam T, Reznikov LL, Dinarello CA. Differences in signaling pathways by IL-1 $\beta$  and IL-18. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Jun 8;101(23):8815–20.
129. Sedimbi SK, Hägglöf T, Karlsson MCI. IL-18 in inflammatory and autoimmune disease. *Cell Mol Life Sci CMLS.* 2013 Dec;70(24):4795–808.
130. Kim S-H, Eisenstein M, Reznikov L, Fantuzzi G, Novick D, Rubinstein M, et al. Structural requirements of six naturally occurring isoforms of the IL-18 binding protein to inhibit IL-18. *Proc Natl Acad Sci.* 2000 Feb 1;97(3):1190–5.
131. Calderara S, Xiang Y, Moss B. Orthopoxvirus IL-18 Binding Proteins: Affinities and Antagonist Activities. *Virology.* 2001 Jan 5;279(1):22–6.

132. Krumm B, Meng X, Wang Z, Xiang Y, Deng J. A Unique Bivalent Binding and Inhibition Mechanism by the Yatapoxvirus Interleukin 18 Binding Protein. *PLoS Pathog.* 2012 Aug 23;8(8):e1002876.
133. Kawashima M, Novick D, Rubinstein M, Miossec P. Regulation of interleukin-18 binding protein production by blood and synovial cells from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2004 Jun 1;50(6):1800–5.
134. Plitz T, Saint-Mézard P, Satho M, Herren S, Waltzinger C, Bittencourt M de C, et al. IL-18 Binding Protein Protects Against Contact Hypersensitivity. *J Immunol.* 2003 Aug 1;171(3):1164–71.
135. Novick D, Schwartzburd B, Pinkus R, Suissa D, Belzer I, Sthoeger Z, et al. A novel IL-18BP ELISA shows elevated serum IL-18BP in sepsis and extensive decrease of free IL-18. *Cytokine.* 2001 Jun 21;14(6):334–42.
136. Dinarello CA, Novick D, Kim S, Kaplanski G. Interleukin-18 and IL-18 binding protein. *Front Inflamm.* 2013;4:289.
137. Xu D, Trajkovic V, Hunter D, Leung BP, Schulz K, Gracie JA, et al. IL-18 induces the differentiation of Th1 or Th2 cells depending upon cytokine milieu and genetic background. *Eur J Immunol.* 2000 Nov 1;30(11):3147–56.
138. Tominaga K, Yoshimoto T, Torigoe K, Kurimoto M, Matsui K, Hada T, et al. IL-12 synergizes with IL-18 or IL-1 $\beta$  for IFN- $\gamma$  production from human T cells. *Int Immunol.* 2000 Feb 1;12(2):151–60.
139. Ussher JE, Bilton M, Attwod E, Shadwell J, Richardson R, de Lara C, et al. CD161 $^{++}$ CD8 $^{+}$ T cells, including the MAIT cell subset, are specifically activated by IL-12+IL-18 in a TCR-independent manner. *Eur J Immunol.* 2014 Jan 1;44(1):195–203.
140. Yang J, Zhu H, Murphy TL, Ouyang W, Murphy KM. IL-18–stimulated GADD45 $\beta$  required in cytokine-induced, but not TCR-induced, IFN- $\gamma$  production. *Nat Immunol.* 2001 Feb;2(2):157–64.
141. Munk RB, Sugiyama K, Ghosh P, Sasaki CY, Rezanka L, Banerjee K, et al. Antigen-independent IFN- $\gamma$  production by human naïve CD4 T cells activated by IL-12 plus IL-18. *PloS One.* 2011;6(5):e18553.
142. Uchida T, Kinoshita M, Fukasawa M, Habu Y, Shinomiya N, Seki S. IL-18 time-dependently modulates Th1/Th2 cytokine production by ligand-activated NKT cells. *Eur J Immunol.* 2007 Apr 1;37(4):966–77.
143. Fukao T, Matsuda S, Koyasu S. Synergistic Effects of IL-4 and IL-18 on IL-12-Dependent IFN- $\gamma$  Production by Dendritic Cells. *J Immunol.* 2000 Jan 1;164(1):64–71.
144. Darwich L, Coma G, Peña R, Bellido R, Blanco EJJ, Este JA, et al. Secretion of interferon-gamma by human macrophages demonstrated at the single-cell level after costimulation with interleukin (IL)-12 plus IL-18. *Immunology.* 2009 Mar;126(3):386–93.



145. Rodrigues DR, Fernandes RK, Balderramas H de A, Penitenti M, Bachiega TF, Calvi SA, et al. Interferon-gamma production by human neutrophils upon stimulation by IL-12, IL-15 and IL-18 and challenge with *Paracoccidioides brasiliensis*. *Cytokine*. 2014 Sep;69(1):102–9.
146. Airolidi I, Gri G, Marshall JD, Corcione A, Facchetti P, Guglielmino R, et al. Expression and Function of IL-12 and IL-18 Receptors on Human Tonsillar B Cells. *J Immunol*. 2000 Dec 15;165(12):6880–8.
147. Sawada M, Kawayama T, Imaoka H, Sakazaki Y, Oda H, Takenaka S, et al. IL-18 Induces Airway Hyperresponsiveness and Pulmonary Inflammation via CD4<sup>+</sup> T Cell and IL-13. *PLoS ONE*. 2013 Jan 29;8(1):e54623.
148. Yoshimoto T, Mizutani H, Tsutsui H, Noben-Trauth N, Yamanaka K, Tanaka M, et al. IL-18 induction of IgE: dependence on CD4<sup>+</sup> T cells, IL-4 and STAT6. *Nat Immunol*. 2000 Aug;1(2):132–7.
149. Yoshimoto T, Nakanishi K. Roles of IL-18 in Basophils and Mast Cells. *Allergol Int*. 2006;55(2):105–13.
150. Leite-de-Moraes MC, Hameg A, Pacilio M, Koezuka Y, Taniguchi M, Kaer LV, et al. IL-18 Enhances IL-4 Production by Ligand-Activated NKT Lymphocytes: A Pro-Th2 Effect of IL-18 Exerted Through NKT Cells. *J Immunol*. 2001 Jan 15;166(2):945–51.
151. Lalor SJ, Dungan LS, Sutton CE, Basdeo SA, Fletcher JM, Mills KHG. Caspase-1–Processed Cytokines IL-1 $\beta$  and IL-18 Promote IL-17 Production by  $\gamma\delta$  and CD4 T Cells That Mediate Autoimmunity. *J Immunol*. 2011 May 15;186(10):5738–48.
152. Conforti-Andreoni C, Spreafico R, Qian HL, Riteau N, Ryffel B, Ricciardi-Castagnoli P, et al. Uric Acid-Driven Th17 Differentiation Requires Inflammasome-Derived IL-1 and IL-18. *J Immunol*. 2011 Dec 1;187(11):5842–50.
153. Yoshimoto T, Okamura H, Tagawa Y-I, Iwakura Y, Nakanishi K. Interleukin 18 together with interleukin 12 inhibits IgE production by induction of interferon- $\gamma$  production from activated B cells. *Proc Natl Acad Sci*. 1997 Apr 15;94(8):3948–53.
154. Wild JS, Sigounas A, Sur N, Siddiqui MS, Alam R, Kurimoto M, et al. IFN- $\gamma$ -Inducing Factor (IL-18) Increases Allergic Sensitization, Serum IgE, Th2 Cytokines, and Airway Eosinophilia in a Mouse Model of Allergic Asthma. *J Immunol*. 2000 Mar 1;164(5):2701–10.
155. Hoshino T, Yagita H, Ortaldo JR, Wiltrot RH, Young HA. In vivo administration of IL-18 can induce IgE production through Th2 cytokine induction and up-regulation of CD40 ligand (CD154) expression on CD4<sup>+</sup> T cells. *Eur J Immunol*. 2000 Jul;30(7):1998–2006.
156. Dao T, Ohashi K, Kayano T, Kurimoto M, Okamura H. Interferon- $\gamma$ -Inducing Factor, a Novel Cytokine, Enhances Fas Ligand-Mediated Cytotoxicity of Murine T Helper 1 Cells. *Cell Immunol*. 1996 Nov 1;173(2):230–5.
157. Hyodo Y, Matsui K, Hayashi N, Tsutsui H, Kashiwamura S, Yamauchi H, et al. IL-18 Up-Regulates Perforin-Mediated NK Activity Without Increasing Perforin Messenger

- RNA Expression by Binding to Constitutively Expressed IL-18 Receptor. *J Immunol*. 1999 Feb 1;162(3):1662–8.
158. Kayagaki N, Yamaguchi N, Nakayama M, Takeda K, Akiba H, Tsutsui H, et al. Expression and Function of TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand on Murine Activated NK Cells. *J Immunol*. 1999 Aug 15;163(4):1906–13.
  159. Srivastava S, Pelloso D, Feng H, Voiles L, Lewis D, Haskova Z, et al. Effects of interleukin-18 on natural killer cells: costimulation of activation through Fc receptors for immunoglobulin. *Cancer Immunol Immunother*. 2013 Jun 1;62(6):1073–82.
  160. Kumano K, Nakao A, Nakajima H, Hayashi F, Kurimoto M, Okamura H, et al. Interleukin-18 Enhances Antigen-induced Eosinophil Recruitment into the Mouse Airways. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999 Sep 1;160(3):873–8.
  161. Wang W, Tanaka T, Okamura H, Sugita M, Higa S, Kishimoto T, et al. Interleukin-18 enhances the production of interleukin-8 by eosinophils. *Eur J Immunol*. 2001;31(4):1010–6.
  162. Chow JY, Wong CK, Cheung PF, Lam CW. Intracellular signaling mechanisms regulating the activation of human eosinophils by the novel Th2 cytokine IL-33: implications for allergic inflammation. *Cell Mol Immunol*. 2009 Dec 23;7(1):26–34.
  163. Pages F, Berger A, Lebel-Binay S, Zinzindohoue F, Danel C, Piqueras B, et al. Proinflammatory and antitumor properties of interleukin-18 in the gastrointestinal tract. *Immunol Lett*. 2000 Dec 1;75(1):9–14.
  164. Zinzindohoué F, Pagès F, Berger A, Danel C, Lazar V, Thiounn N, et al. Implications cliniques de la production d'interleukine-18 par la muqueuse digestive. *Gastroenterol Clin Biol*. 2001;25:761–9.
  165. Möller P, Walczak H, Reidl S, Sträter J, Krammer PH. Paneth cells express high levels of CD95 ligand transcripts: a unique property among gastrointestinal epithelia. *Am J Pathol*. 1996 Jul;149(1):9–13.
  166. Sträter J, Wellisch I, Riedl S, Walczak H, Koretz K, Tandara A, et al. CD95 (APO-1/Fas)-mediated apoptosis in colon epithelial cells: A possible role in ulcerative colitis. *Gastroenterology*. 1997 Jul;113(1):160–7.
  167. Hershberg RM, Mayer LF. Antigen processing and presentation by intestinal epithelial cells – polarity and complexity. *Immunol Today*. 2000 Mar 1;21(3):123–8.
  168. Thelemann C, Eren RO, Coutaz M, Brasseit J, Bouzourene H, Rosa M, et al. Interferon- $\gamma$  Induces Expression of MHC Class II on Intestinal Epithelial Cells and Protects Mice from Colitis. *PLoS ONE*. 2014 Jan 28;9(1):e86844.
  169. Okazawa A, Kanai T, Nakamaru K, Sato T, Inoue N, Ogata H, et al. Human intestinal epithelial cell-derived interleukin (IL)-18, along with IL-2, IL-7 and IL-15, is a potent synergistic factor for the proliferation of intraepithelial lymphocytes. *Clin Exp Immunol*. 2004;136(2):269–76.

170. Tsutsui H, Nakanishi K. Immunotherapeutic applications of IL-18. *Immunotherapy*. 2012 Dec;4(12):1883–94.
171. Lopetuso LR, Chowdhry S, Pizarro TT. Opposing Functions of Classic and Novel IL-1 Family Members in Gut Health and Disease. *Front Immunol*. 2013;4:181.
172. Pizarro TT, Michie MH, Bentz M, Woraratanadharm J, Smith MF, Foley E, et al. IL-18, a Novel Immunoregulatory Cytokine, Is Up-Regulated in Crohn's Disease: Expression and Localization in Intestinal Mucosal Cells. *J Immunol*. 1999 Jun 1;162(11):6829–35.
173. Sivakumar PV, Westrich GM, Kanaly S, Garka K, Born TL, Derry JMJ, et al. Interleukin 18 is a primary mediator of the inflammation associated with dextran sulphate sodium induced colitis: blocking interleukin 18 attenuates intestinal damage. *Gut*. 2002 Jun 1;50(6):812–20.
174. Siegmund B, Lehr H-A, Fantuzzi G, Dinarello CA. IL-1 $\beta$ -converting enzyme (caspase-1) in intestinal inflammation. *Proc Natl Acad Sci*. 2001 Nov 6;98(23):13249–54.
175. Ishikura T, Kanai T, Uraushihara K, Iiyama R, Makita S, Totsuka T, et al. Interleukin-18 overproduction exacerbates the development of colitis with markedly infiltrated macrophages in interleukin-18 transgenic mice. *J Gastroenterol Hepatol*. 2003;18(8):960–9.
176. Takagi H, Kanai T, Okazawa A, Kishi Y, Sato T, Takaishi H, et al. Contrasting action of IL-12 and IL-18 in the development of dextran sodium sulphate colitis in mice. *Scand J Gastroenterol*. 2003 Aug;38(8):837–44.
177. Araki A, Kanai T, Ishikura T, Makita S, Uraushihara K, Iiyama R, et al. MyD88-deficient mice develop severe intestinal inflammation in dextran sodium sulfate colitis. *J Gastroenterol*. 2005 Jan 1;40(1):16–23.
178. Zaki MH, Boyd KL, Vogel P, Kastan MB, Lamkanfi M, Kanneganti T-D. The NLRP3 Inflammasome Protects against Loss of Epithelial Integrity and Mortality during Experimental Colitis. *Immunity*. 2010 Mar 26;32(3):379–91.
179. Dupaul-Chicoine J, Yeretssian G, Doiron K, Bergstrom KSB, McIntire CR, LeBlanc PM, et al. Control of Intestinal Homeostasis, Colitis, and Colitis-Associated Colorectal Cancer by the Inflammatory Caspases. *Immunity*. 2010 Mar 26;32(3):367–78.
180. Palma G, Barbieri A, Bimonte S, Palla M, Zappavigna S, Caraglia M, et al. Interleukin 18: Friend or foe in cancer. *Biochim Biophys Acta BBA - Rev Cancer*. 2013 Dec;1836(2):296–303.
181. Nakamori M, Iwahashi M, Nakamura M, Ueda K, Zhang X, Yamaue H. Intensification of Antitumor Effect by T Helper 1-dominant Adoptive Immunogene Therapy for Advanced Orthotopic Colon Cancer. *Clin Cancer Res*. 2003 Jun 1;9(6):2357–65.
182. Hashimoto W, Osaki T, Okamura H, Robbins PD, Kurimoto M, Nagata S, et al. Differential Antitumor Effects of Administration of Recombinant IL-18 or Recombinant IL-12 Are Mediated Primarily by Fas-Fas Ligand- and Perforin-Induced Tumor Apoptosis, Respectively. *J Immunol*. 1999 Jul 15;163(2):583–9.

183. Osaki T, Péron J-M, Cai Q, Okamura H, Robbins PD, Kurimoto M, et al. IFN- $\gamma$ -Inducing Factor/IL-18 Administration Mediates IFN- $\gamma$ - and IL-12-Independent Antitumor Effects. *J Immunol*. 1998 Feb 15;160(4):1742–9.
184. Tian H, Shi G, Yang G, Zhang J, Li Y, Du T, et al. Cellular immunotherapy using irradiated lung cancer cell vaccine co-expressing GM-CSF and IL-18 can induce significant antitumor effects. *BMC Cancer*. 2014;14(1):48.
185. Itzkowitz SH, Yio X. Inflammation and Cancer IV. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: the role of inflammation. *Am J Physiol - Gastrointest Liver Physiol*. 2004 Jul 1;287(1):G7–17.
186. Salcedo R, Worschech A, Cardone M, Jones Y, Gyulai Z, Dai R-M, et al. MyD88-mediated signaling prevents development of adenocarcinomas of the colon: role of interleukin 18. *J Exp Med*. 2010 Aug 2;207(8):1625–36.
187. Zaki MH, Vogel P, Body-Malapel M, Lamkanfi M, Kanneganti T-D. IL-18 Production Downstream of the Nlrp3 Inflammasome Confers Protection against Colorectal Tumor Formation. *J Immunol*. 2010 Oct 15;185(8):4912–20.
188. Allen IC, TeKippe EM, Woodford R-MT, Uronis JM, Holl EK, Rogers AB, et al. The NLRP3 inflammasome functions as a negative regulator of tumorigenesis during colitis-associated cancer. *J Exp Med*. 2010 May 10;207(5):1045–56.
189. Kuhara T, Iigo M, Itoh T, Ushida Y, Sekine K, Terada N, et al. Orally administered lactoferrin exerts an antimetastatic effect and enhances production of IL-18 in the intestinal epithelium. *Nutr Cancer*. 2000;38(2):192–9.
190. Park S, Cheon S, Cho D. The dual effects of interleukin-18 in tumor progression. *Cell Mol Immunol*. 2007 Oct;4(5):329–35.
191. Kuppala MB, Syed SB, Bandaru S, Varre S, Akka J, Mundulru HP. Immunotherapeutic approach for better management of cancer--role of IL-18. *Asian Pac J Cancer Prev APJCP*. 2012;13(11):5353–61.
192. Hoffmann D, Bayer W, Grunwald T, Wildner O. Intratumoral expression of respiratory syncytial virus fusion protein in combination with cytokines encoded by adenoviral vectors as in situ tumor vaccine for colorectal cancer. *Mol Cancer Ther*. 2007 Jul 1;6(7):1942–50.
193. Tanaka F, Hashimoto W, Okamura H, Robbins PD, Lotze MT, Tahara H. Rapid Generation of Potent and Tumor-specific Cytotoxic T Lymphocytes by Interleukin 18 Using Dendritic Cells and Natural Killer Cells. *Cancer Res*. 2000 Sep 1;60(17):4838–44.
194. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol*. 2002 Nov;3(11):991–8.
195. Mittal D, Gubin MM, Schreiber RD, Smyth MJ. New insights into cancer immunoediting and its three component phases — elimination, equilibrium and escape. *Curr Opin Immunol*. 2014 Apr;27:16–25.

196. Jessy T. Immunity over inability: The spontaneous regression of cancer. *J Nat Sci Biol Med.* 2011;2(1):43.
197. Degiovanni G, Hainaut P, Lahaye T, Weynants P, Boon T. Antigens recognized on a melanoma cell line by autologous cytolytic T lymphocytes are also expressed on freshly collected tumor cells. *Eur J Immunol.* 1990 Aug;20(8):1865–8.
198. Bui JD, Schreiber RD. Cancer immunosurveillance, immunoediting and inflammation: independent or interdependent processes? *Curr Opin Immunol.* 2007 Apr;19(2):203–8.
199. Mattes J, Hulett M, Xie W, Hogan S, Rothenberg ME, Foster P, et al. Immunotherapy of Cytotoxic T Cell-resistant Tumors by T Helper 2 Cells An Eotaxin and STAT6-dependent Process. *J Exp Med.* 2003 Feb 3;197(3):387–93.
200. Ellyard JI, Simson L, Parish CR. Th2-mediated anti-tumour immunity: friend or foe? *Tissue Antigens.* 2007 Jul 1;70(1):1–11.
201. Costello R, O’Callaghan T, Sébahoun G. [Eosinophils and antitumour response]. *Rev Médecine Interne.* 2005 Jun;26(6):479–84.
202. Waldhauer I, Steinle A. NK cells and cancer immunosurveillance. *Oncogene.* 2008;27(45):5932–43.
203. Narendra BL, Reddy KE, Shantikumar S, Ramakrishna S. Immune system: a double-edged sword in cancer. *Inflamm Res.* 2013 Sep 1;62(9):823–34.
204. Locati M, Mantovani A, Sica A. Chapter Six - Macrophage Activation and Polarization as an Adaptive Component of Innate Immunity. In: Kenneth M. Murphy and Miriam Merad, editor. *Advances in Immunology.* Academic Press; 2013. p. 163–84.
205. Long KB, Beatty GL. Harnessing the antitumor potential of macrophages for cancer immunotherapy. *Oncoimmunology.* 2013 Dec 1;2(12):e26860.
206. Darcy PK, Neeson P, Yong CS, Kershaw MH. Manipulating immune cells for adoptive immunotherapy of cancer. *Curr Opin Immunol.* 2014 Apr;27:46–52.
207. Dalton DK, Noelle RJ. The roles of mast cells in anticancer immunity. *Cancer Immunol Immunother.* 2012 Sep 1;61(9):1511–20.
208. Munitz A, Levi-Schaffer F. Eosinophils: “new” roles for “old” cells. *Allergy.* 2004;59(3):268–75.
209. Lowe D, Jorizzo J, Hutt MS. Tumour-associated eosinophilia: a review. *J Clin Pathol.* 1981 Dec 1;34(12):1343–8.
210. Lowe D, Fletcher CD, Shaw MP, McKee PH. Eosinophil infiltration in keratoacanthoma and squamous cell carcinoma of the skin. *Histopathology.* 1984 Jul;8(4):619–25.
211. Dorta RG, Landman G, Kowalski LP, Lauris JRP, Latorre MRDO, Oliveira DT. Tumour-associated tissue eosinophilia as a prognostic factor in oral squamous cell carcinomas. *Histopathology.* 2002;41(2):152–7.

212. Alkhabuli JO, High AS. Significance of eosinophil counting in tumor associated tissue eosinophilia (TATE). *Oral Oncol.* 2006 Sep;42(8):849–50.
213. Pretlow TP, Keith EF, Cryar AK, Bartolucci AA, Pitts AM, Pretlow TG, et al. Eosinophil Infiltration of Human Colonic Carcinomas as a Prognostic Indicator. *Cancer Res.* 1983 Jun 1;43(6):2997–3000.
214. Fernández-Aceñero MJ, Galindo-Gallego M, Sanz J, Aljama A. Prognostic influence of tumor-associated eosinophilic infiltrate in colorectal carcinoma. *Cancer.* 2000;88(7):1544–8.
215. Nielsen HJ, Hansen U, Christensen IJ, Reimert CM, Brünner N, Moesgaard F. Independent prognostic value of eosinophil and mast cell infiltration in colorectal cancer tissue. *J Pathol.* 1999;189(4):487–95.
216. Prizment AE, Anderson KE, Visvanathan K, Folsom AR. Inverse Association of Eosinophil Count with Colorectal Cancer Incidence: Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2011 Sep 1;20(9):1861–4.
217. Ishibashi S, Ohashi Y, Suzuki T, Miyazaki S, Moriya T, Satomi S, et al. Tumor-associated Tissue Eosinophilia in Human Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Anticancer Res.* 2006 Mar 1;26(2B):1419–24.
218. Cuschieri A, Talbot IC, Weeden S. Influence of pathological tumour variables on long-term survival in resectable gastric cancer. *Br J Cancer.* 2002 Mar 8;86(5):674–9.
219. Nagtegaal ID, Marijnen CA, Kranenbarg EK, Mulder-Stapel A, Hermans J, van de Velde CJ, et al. Local and distant recurrences in rectal cancer patients are predicted by the nonspecific immune response; specific immune response has only a systemic effect--a histopathological and immunohistochemical study. *BMC Cancer.* 2001;1:7.
220. Fujii M, Yamashita T, Ishiguro R, Tashiro M, Kameyama K. Significance of epidermal growth factor receptor and tumor associated tissue eosinophilia in the prognosis of patients with nasopharyngeal carcinoma. *Auris Nasus Larynx.* 2002 Apr 1;29(2):175–81.
221. Ono Y, Ozawa M, Tamura Y, Suzuki T, Suzuki K, Kurokawa K, et al. Tumor-associated tissue eosinophilia of penile cancer. *Int J Urol.* 2002;9(2):82–7.
222. Luna-Moré S, Florez P, Ayala A, Diaz F, Santos A. Neutral and Acid Mucins and Eosinophil and Argyrophil Crystalloids in Carcinoma and Atypical Adenomatous Hyperplasia of the Prostate. *Pathol - Res Pract.* 1997;193(4):291–8.
223. Wasielewski R von, Seth S, Franklin J, Fischer R, Hübner K, Hansmann ML, et al. Tissue eosinophilia correlates strongly with poor prognosis in nodular sclerosing Hodgkin's disease, allowing for known prognostic factors. *Blood.* 2000 Feb 15;95(4):1207–13.
224. Aldinucci D, Gloghini A, Pinto A, De Filippi R, Carbone A. The classical Hodgkin's lymphoma microenvironment and its role in promoting tumour growth and immune escape. *J Pathol.* 2010;221(3):248–63.

225. Molin D. Bystander cells and prognosis in Hodgkin lymphoma. Review based on a doctoral thesis. *Ups J Med Sci.* 2004;109(3):179–228.
226. Glimelius I, Rubin J, Rostgaard K, Amini R-M, Simonsson M, Sorensen KM, et al. Predictors of histology, tissue eosinophilia and mast cell infiltration in Hodgkin's Lymphoma – a population-based study. *Eur J Haematol.* 2011;87(3):208–16.
227. Geisinger KR, Steffee CH, McGee RS, Woodruff RD, Buss DH. The cytomorphologic features of sclerosing mucoepidermoid carcinoma of the thyroid gland with eosinophilia. *Am J Clin Pathol.* 1998 Mar;109(3):294–301.
228. Fridlender ZG, Simon H-U, Shalit M. Metastatic carcinoma presenting with concomitant eosinophilia and thromboembolism. *Am J Med Sci.* 2003 Aug;326(2):98–101.
229. Dibbert B, Daigle I, Braun D, Schranz C, Weber M, Blaser K, et al. Role for Bcl-xL in delayed eosinophil apoptosis mediated by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-5. *Blood.* 1998 Aug 1;92(3):778–83.
230. Teruya-Feldstein J, Jaffe ES, Burd PR, Kingma DW, Setsuda JE, Tosato G. Differential Chemokine Expression in Tissues Involved by Hodgkin's Disease: Direct Correlation of Eotaxin Expression and Tissue Eosinophilia Presented in part at the 39th Annual Meeting of the American Society of Hematology, held in San Diego, CA, December 5-9, 1997. *Blood.* 1999 Apr 15;93(8):2463–70.
231. Lorena S, Oliveira D, Dorta R, Landman G, Kowalski L. Eotaxin expression in oral squamous cell carcinomas with and without tumour associated tissue eosinophilia. *Oral Dis.* 2003;9(6):279–83.
232. Thielen C, Radermacher V, Trimeche M, Roufosse F, Goldman M, Boniver J, et al. TARC and IL-5 expression correlates with tissue eosinophilia in peripheral T-cell lymphomas. *Leuk Res.* 2008 Sep;32(9):1431–8.
233. Cormier SA, Taranova AG, Bedient C, Nguyen T, Protheroe C, Pero R, et al. Pivotal Advance: Eosinophil infiltration of solid tumors is an early and persistent inflammatory host response. *J Leukoc Biol.* 2006 Jun 1;79(6):1131–9.
234. Lotfi R, Lee JJ, Lotze MT. Eosinophilic granulocytes and damage-associated molecular pattern molecules (DAMPs): role in the inflammatory response within tumors. *J Immunother Hagerstown Md* 1997. 2007 Jan;30(1):16–28.
235. Ito N, DeMarco RA, Mailliard RB, Han J, Rabinowich H, Kalinski P, et al. Cytolytic cells induce HMGB1 release from melanoma cell lines. *J Leukoc Biol.* 2007 Jan 1;81(1):75–83.
236. Lotfi R, Herzog GI, DeMarco RA, Beer-Stolz D, Lee JJ, Rubartelli A, et al. Eosinophils Oxidize Damage-Associated Molecular Pattern Molecules Derived from Stressed Cells. *J Immunol.* 2009 Oct 15;183(8):5023–31.
237. Sun P, Ben Q, Tu S, Dong W, Qi X, Wu Y. Serum Interleukin-33 Levels in Patients with Gastric Cancer. *Dig Dis Sci.* 2011 Dec 1;56(12):3596–601.

238. Ikutani M, Yanagibashi T, Ogasawara M, Tsuneyama K, Yamamoto S, Hattori Y, et al. Identification of Innate IL-5–Producing Cells and Their Role in Lung Eosinophil Regulation and Antitumor Immunity. *J Immunol.* 2012 Jan 15;188(2):703–13.
239. Mirey E. L’interleukine-33, un nouvel acteur de la réponse anti-tumorale dans un modèle murin de cancer du côlon. Université de Toulouse; 2014.
240. Caruso RA, Parisi A, Quattrocchi E, Scardigno M, Branca G, Parisi C, et al. Ultrastructural Descriptions of Heterotypic Aggregation between Eosinophils and Tumor Cells in Human Gastric Carcinomas. *Ultrastruct Pathol.* 2011 Aug;35(4):145–9.
241. Huland E, Huland H. Tumor-associated eosinophilia in interleukin-2-treated patients: evidence of toxic eosinophil degranulation on bladder cancer cells. *J Cancer Res Clin Oncol.* 1992 Jun 1;118(6):463–7.
242. Simon H-U, Plötz S, Simon D, Seitzer U, Braathen LR, Menz G, et al. Interleukin-2 primes eosinophil degranulation in hypereosinophilia and Wells’ syndrome. *Eur J Immunol.* 2003;33(4):834–9.
243. Sosman JA, Bartemes K, Offord KP, Kita H, Fisher SG, Kefer C, et al. Evidence for eosinophil activation in cancer patients receiving recombinant interleukin-4: effects of interleukin-4 alone and following interleukin-2 administration. *Clin Cancer Res.* 1995 Aug 1;1(8):805–12.
244. Tepper RI, Coffman RL, Leder P. An eosinophil-dependent mechanism for the antitumor effect of interleukin-4. *Science.* 1992 Jul 24;257(5069):548–51.
245. Rivoltini L, Viggiano V, Spinazzè S, Santoro A, Colombo MP, Takatsu K, et al. In vitro anti-tumor activity of eosinophils from cancer patients treated with subcutaneous administration of interleukin 2. Role of interleukin 5. *Int J Cancer J Int Cancer.* 1993 Apr 22;54(1):8–15.
246. Benatar T, Cao MY, Lee Y, Lightfoot J, Feng N, Gu X, et al. IL-17E, a proinflammatory cytokine, has antitumor efficacy against several tumor types in vivo. *Cancer Immunol Immunother.* 2010 Jun 1;59(6):805–17.
247. Simson L, Ellyard JJ, Dent LA, Matthaei KI, Rothenberg ME, Foster PS, et al. Regulation of Carcinogenesis by IL-5 and CCL11: A Potential Role for Eosinophils in Tumor Immune Surveillance. *J Immunol.* 2007 Apr 1;178(7):4222–9.
248. Decot V, Woerly G, Loyens M, Loiseau S, Quatannens B, Capron M, et al. Heterogeneity of Expression of IgA Receptors by Human, Mouse, and Rat Eosinophils. *J Immunol.* 2005 Jan 15;174(2):628–35.
249. Lee JJ, Jacobsen EA, Ochkur SI, McGarry MP, Condjella RM, Doyle AD, et al. Human versus mouse eosinophils: “That which we call an eosinophil, by any other name would stain as red.” *J Allergy Clin Immunol.* 2012 Sep;130(3):572–84.
250. Legrand F, Driss V, Delbeke M, Loiseau S, Hermann E, Dombrowicz D, et al. Human Eosinophils Exert TNF- $\alpha$  and Granzyme A-Mediated Tumoricidal Activity toward Colon Carcinoma Cells. *J Immunol.* 2010 Dec 15;185(12):7443–51.



251. Jensen-Jarolim E, Achatz G, Turner MC, Karagiannis S, Legrand F, Capron M, et al. AllergoOncology: the role of IgE-mediated allergy in cancer. *Allergy*. 2008;63(10):1255–66.
252. Wang H, Diepgen TL. Is atopy a protective or a risk factor for cancer? A review of epidemiological studies. *Allergy*. 2005;60(9):1098–111.
253. Turner MC. Epidemiology: allergy history, IgE, and cancer. *Cancer Immunol Immunother*. 2012 Sep 1;61(9):1493–510.
254. Karagiannis SN, Josephs DH, Karagiannis P, Gilbert AE, Saul L, Rudman SM, et al. Recombinant IgE antibodies for passive immunotherapy of solid tumours: from concept towards clinical application. *Cancer Immunol Immunother*. 2012 Sep 1;61(9):1547–64.
255. Singer J, Jensen-Jarolim E. IgE-based immunotherapy of cancer: challenges and chances. *Allergy*. 2014 Feb 1;69(2):137–49.
256. Spillner E, Plum M, Blank S, Miehe M, Singer J, Braren I. Recombinant IgE antibody engineering to target EGFR. *Cancer Immunol Immunother*. 2012 Sep 1;61(9):1565–73.
257. Daniels TR, Leuchter RK, Quintero R, Helguera G, Rodríguez JA, Martínez-Maza O, et al. Targeting HER2/neu with a fully human IgE to harness the allergic reaction against cancer cells. *Cancer Immunol Immunother CII*. 2012 Jul;61(7):991–1003.
258. Tai PC, Spry CJ, Bakes DM, Barkans JR. Eosinophil membrane antigens: phenotypic frequencies in normal individuals and patients with the hypereosinophilic syndrome. *Int Arch Allergy Appl Immunol*. 1985;77(1-2):249–51.
259. Bleijs DA, de Waal-Malefyt R, Figdor CG, van Kooyk Y. Co-stimulation of T cells results in distinct IL-10 and TNF- $\alpha$  cytokine profiles dependent on binding to ICAM-1, ICAM-2 or ICAM-3. *Eur J Immunol*. 1999 Jul 1;29(7):2248–58.
260. Laukoetter MG, Nava P, Lee WY, Severson EA, Capaldo CT, Babbin BA, et al. JAM-A regulates permeability and inflammation in the intestine in vivo. *J Exp Med*. 2007 Dec 24;204(13):3067–76.
261. Costain DJ, Guha AK, Liwski RS, Lee TDG. Murine hypodense eosinophils induce tumour cell apoptosis by a granzyme B-dependent mechanism. *Cancer Immunol Immunother*. 2001 Aug 1;50(6):293–9.
262. Higashi K, Hazama S, Araki A, Yoshimura K, Iizuka N, Yoshino S, et al. A novel cancer vaccine strategy with combined IL-18 and HSV-TK gene therapy driven by the hTERT promoter in a murine colorectal cancer model. *Int J Oncol*. 2014 Jul 22;45:1412–20.
263. Janowski AM, Kolb R, Zhang W, Sutterwala FS. Beneficial and detrimental roles of NLRs in carcinogenesis. *Front Mol Innate Immun*. 2013;4:370.
264. Gao X, Wang X, Yang Q, Zhao X, Wen W, Li G, et al. Tumoral Expression of IL-33 Inhibits Tumor Growth and Modifies the Tumor Microenvironment through CD8<sup>+</sup> T and NK Cells. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2014 Nov 26;

265. Kang R, Chen R, Zhang Q, Hou W, Wu S, Cao L, et al. HMGB1 in health and disease. *Mol Aspects Med.* 2014 Dec;40:1–116.
266. Yang S, Xu L, Yang T, Wang F. High-mobility group box-1 and its role in angiogenesis. *J Leukoc Biol.* 2014 Apr 1;95(4):563–74.
267. Campana L, Bosurgi L, Rovere-Querini P. HMGB1: a two-headed signal regulating tumor progression and immunity. *Curr Opin Immunol.* 2008 Oct;20(5):518–23.
268. Curran CS, Bertics PJ. Human eosinophils express RAGE, produce RAGE ligands, exhibit PKC-delta phosphorylation and enhanced viability in response to the RAGE ligand, S100B. *Int Immunol.* 2011 Dec;23(12):713–28.
269. Nutten S, Papin J-P, Woerly G, Dunne DW, MacGregor J, Trottein F, et al. Selectin and Lewisx are required as co-receptors in antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity of human eosinophils to *Schistosoma mansoni* schistosomula. *Eur J Immunol.* 1999 Mar 1;29(3):799–808.
270. Abraham D, Leon O, Schnyder-Candrian S, Wang CC, Galioto AM, Kerepesi LA, et al. Immunoglobulin E and eosinophil-dependent protective immunity to larval *Onchocerca volvulus* in mice immunized with irradiated larvae. *Infect Immun.* 2004 Feb;72(2):810–7.
271. Wu Y-L, Ding Y-P, Tanaka Y, Shen L-W, Wei C-H, Minato N, et al.  $\gamma\delta$  T cells and their potential for immunotherapy. *Int J Biol Sci.* 2014;10(2):119–35.
272. Legrand F. Eosinophiles et immunité innée:: expression et rôle de TCR  $\gamma\delta$  dans la cytotoxicité anti-tumorale. Université de Lille 2; 2008.
273. Dar AA, Patil RS, Chiplunkar SV. Insights into the relationship between toll like receptors and gamma delta T cell responses. *Tumor Immun.* 2014;5:366.
274. Munitz A, Bachelet I, Fraenkel S, Katz G, Mandelboim O, Simon H-U, et al. 2B4 (CD244) Is Expressed and Functional on Human Eosinophils. *J Immunol.* 2005 Jan 1;174(1):110–8.
275. El-Shazly AE, Henket M, Lefebvre PP, Louis R. 2B4 (CD244) is involved in eosinophil adhesion and chemotaxis, and its surface expression is increased in allergic rhinitis after challenge. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2011 Dec;24(4):949–60.
276. Kataoka S, Konishi Y, Nishio Y, Fujikawa-Adachi K, Tominaga A. Antitumor Activity of Eosinophils Activated by IL-5 and Eotaxin against Hepatocellular Carcinoma. *DNA Cell Biol.* 2004 Sep 1;23(9):549–60.
277. Davoine F, Labonté I, Ferland C, Mazer B, Chakir J, Laviolette M. Role and Modulation of CD16 Expression on Eosinophils by Cytokines and Immune Complexes. *Int Arch Allergy Immunol.* 2004;134(2):165–72.
278. Malm-Erjefält M, Greiff L, Ankerst J, Andersson M, Wallengren J, Cardell L-O, et al. Circulating eosinophils in asthma, allergic rhinitis, and atopic dermatitis lack morphological signs of degranulation. *Clin Exp Allergy.* 2005;35(10):1334–40.

279. Nissim Ben Efraim AH, Munitz A, Sherman Y, Mazer BD, Levi-Schaffer F, Eliashar R. Efficient purification of eosinophils from human tissues: A comparative study. *J Immunol Methods*. 2009 Apr 15;343(2):91–6.
280. Mortuaire G, Gengler I, vandenhende C, Delbeke M, Gatault S, Chevalier D, et al. Blood and mucosal eosinophils immune profile modulation in nasal polyposis with concomitant asthma. *Ann Allerg Asthma Im*. Accepted.
281. Tanaka T, Kohno H, Suzuki R, Yamada Y, Sugie S, Mori H. A novel inflammation-related mouse colon carcinogenesis model induced by azoxymethane and dextran sodium sulfate. *Cancer Sci*. 2003 Nov;94(11):965–73.
282. Irving AA, Yoshimi K, Hart ML, Parker T, Clipson L, Ford MR, et al. The utility of Apc-mutant rats in modeling human colon cancer. *Dis Model Mech*. 2014 Nov 1;7(11):1215–25.
283. Gleich GJ, Klion AD, Lee JJ, Weller PF. The consequences of not having eosinophils. *Allergy*. 2013;68(7):829–35.
284. Zimmermann N, McBride ML, Yamada Y, Hudson SA, Jones C, Cromie KD, et al. Siglec-F antibody administration to mice selectively reduces blood and tissue eosinophils. *Allergy*. 2008;63(9):1156–63.
285. Yoon J, Ponikau JU, Lawrence CB, Kita H. Innate antifungal immunity of human eosinophils mediated by a beta 2 integrin, CD11b. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2008 Aug 15;181(4):2907–15.
286. Fraemohs L, Koenen RR, Ostermann G, Heinemann B, Weber C. The Functional Interaction of the  $\beta 2$  Integrin Lymphocyte Function-Associated Antigen-1 with Junctional Adhesion Molecule-A Is Mediated by the I Domain. *J Immunol*. 2004 Nov 15;173(10):6259–64.
287. Wojcikiewicz EP, Koenen RR, Fraemohs L, Minkiewicz J, Azad H, Weber C, et al. LFA-1 Binding Destabilizes the JAM-A Homophilic Interaction During Leukocyte Transmigration. *Biophys J*. 2009 Jan 7;96(1):285–93.
288. Yan J, Jiang Y, Ye M, Liu W, Feng L. The clinical value of lymphatic vessel density, intercellular adhesion molecule 1 and vascular cell adhesion molecule 1 expression in patients with oral tongue squamous cell carcinoma. *J Cancer Res Ther*. 2014 Nov;10 Suppl:C125–30.
289. Laurent VM, Duperray A, Sundar Rajan V, Verdier C. Atomic force microscopy reveals a role for endothelial cell icam-1 expression in bladder cancer cell adherence. *PloS One*. 2014;9(5):e98034.
290. Kotteas EA, Boulas P, Gkiozos I, Tsagkouli S, Tsoukalas G, Syrigos KN. The Intercellular Cell Adhesion Molecule-1 (ICAM-1) in Lung Cancer: Implications for Disease Progression and Prognosis. *Anticancer Res*. 2014 Sep 1;34(9):4665–72.
291. Haustein M, Ramer R, Linnebacher M, Manda K, Hinz B. Cannabinoids increase lung cancer cell lysis by lymphokine-activated killer cells via upregulation of ICAM-1. *Biochem Pharmacol*. 2014;

292. Ren Z, Kang W, Wang L, Sun B, Ma J, Zheng C, et al. E2F1 renders prostate cancer cell resistant to ICAM-1 mediated antitumor immunity by NF- $\kappa$ B modulation. *Mol Cancer*. 2014;13(1):84.
293. Wang E, Zhang Q, Liu X, Zhang T, Zhang X, Zhao L, et al. The dual-functional capability of cytokine-induced killer cells and application in tumor immunology. *Hum Immunol*. 2014 Oct 8;
294. Tachimori A, Yamada N, Sakate Y, Yashiro M, Maeda K, Ohira M, et al. Up regulation of ICAM-1 gene expression inhibits tumour growth and liver metastasis in colorectal carcinoma. *Eur J Cancer*. 2005 Aug;41(12):1802–10.
295. Wang R, Jaw JJ, Stutzman NC, Zou Z, Sun PD. Natural killer cell-produced IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  induce target cell cytotoxicity through up-regulation of ICAM-1. *J Leukoc Biol*. 2012 Feb 1;91(2):299–309.
296. Anikeeva N, Steblyanko M, Fayngerts S, Kopylova N, Marshall DJ, Powers GD, et al. Integrin receptors on tumor cells facilitate NK cell-mediated antibody-dependent cytotoxicity. *Eur J Immunol*. 2014 Aug 1;44(8):2331–9.
297. Tomita Y, Watanabe H, Kobayashi H, Nishiyama T, Tsuji S, Imai K, et al. Expression of intercellular adhesion molecule-1 on transitional cell cancer. Possible significance in immunity against tumor cells. *Am J Pathol*. 1993 Jul;143(1):191.
298. Kohka H, Yoshino T, Iwagaki H, Sakuma I, Tanimoto T, Matsuo Y, et al. Interleukin-18/interferon-gamma-inducing factor, a novel cytokine, up-regulates ICAM-1 (CD54) expression in KG-1 cells. *J Leukoc Biol*. 1998 Oct 1;64(4):519–27.
299. Stuyt RJL, Netea MG, Geijtenbeek TBH, Kullberg BJ, Dinarello CA, Van Der Meer JWM. Selective regulation of intercellular adhesion molecule-1 expression by interleukin-18 and interleukin-12 on human monocytes. *Immunology*. 2003;110(3):329–34.
300. Mills CD, Kincaid K, Alt JM, Heilman MJ, Hill AM. M-1/M-2 Macrophages and the Th1/Th2 Paradigm. *J Immunol*. 2000 Jun 15;164(12):6166–73.
301. Lamkhioed B, Gounni AS, Aldebert D, Delaporte E, Prin L, Capron A, et al. Synthesis of Type 1 (IFN $\gamma$ ) and Type 2 (IL-4, IL-5, and IL-10) Cytokines by Human Eosinophils. *Ann N Y Acad Sci*. 1996;796(1):203–8.
302. Spencer LA, Szela CT, Perez SAC, Kirchhoffer CL, Neves JS, Radke AL, et al. Human eosinophils constitutively express multiple Th1, Th2, and immunoregulatory cytokines that are secreted rapidly and differentially. *J Leukoc Biol*. 2009 Jan 1;85(1):117–23.
303. Jönsson U-B, Håkansson LD, Jögi R, Janson C, Venge P. Associations of ECP (eosinophil cationic protein)-gene polymorphisms to allergy, asthma, smoke habits and lung function in two Estonian and Swedish sub cohorts of the ECRHS II study. *BMC Pulm Med*. 2010;10:36.
304. Sedgwick JB, Vrtis RF, Jansen KJ, Kita H, Bartemes K, Busse WW. Peripheral blood eosinophils from patients with allergic asthma contain increased intracellular eosinophil-derived neurotoxin. *J Allergy Clin Immunol*. 2004 Sep;114(3):568–74.

305. Kang JS, Y.Bae S, R.Kim H, Kim YS, J.Kim D, Cho BJ, et al. Interleukin-18 increases metastasis and immune escape of stomach cancer via the downregulation of CD70 and maintenance of CD44. *Carcinogenesis*. 2009 Dec 1;30(12):1987–96.
306. Robertson MJ, Mier JW, Logan T, Atkins M, Koon H, Koch KM, et al. Clinical and Biological Effects of Recombinant Human Interleukin-18 Administered by Intravenous Infusion to Patients with Advanced Cancer. *Clin Cancer Res*. 2006 Jul 15;12(14):4265–73.
307. Zaki MH, Lamkanfi M, Kanneganti T-D. The Nlrp3 inflammasome: contributions to intestinal homeostasis. *Trends Immunol*. 2011 avril;32(4):171–9.
308. Terlizzi M, Casolaro V, Pinto A, Sorrentino R. Inflammasome: cancer’s friend or foe? *Pharmacol Ther*. 2014 Jul;143(1):24–33.
309. Chen GY, Liu M, Wang F, Bertin J, Núñez G. A Functional Role for Nlrp6 in Intestinal Inflammation and Tumorigenesis. *J Immunol*. 2011 Jun 15;186(12):7187–94.
310. Hu B, Elinav E, Huber S, Booth CJ, Strowig T, Jin C, et al. Inflammation-induced tumorigenesis in the colon is regulated by caspase-1 and NLRC4. *Proc Natl Acad Sci*. 2010 Dec 14;107(50):21635–40.
311. Tuncer S, Fiorillo MT, Sorrentino R. The multifaceted nature of NLRP12. *J Leukoc Biol*. 2014 Dec 1;96(6):991–1000.
312. Rathinam VAK, Vanaja SK, Fitzgerald KA. Regulation of inflammasome signaling. *Nat Immunol*. 2012 Apr;13(4):333–42.
313. Schorn C, Janko C, Latzko M, Chaurio R, Schett G, Herrmann M. Monosodium urate crystals induce extracellular DNA traps in neutrophils, eosinophils, and basophils but not in mononuclear cells. *Front Immunol*. 2012;3:277.
314. Kobayashi T, Kouzaki H, Kita H. Human Eosinophils Recognize Endogenous Danger Signal Crystalline Uric Acid and Produce Proinflammatory Cytokines Mediated by Autocrine ATP. *J Immunol*. 2010 Jun 1;184(11):6350–8.
315. Liao Y-H, Lin Y-C, Tsao S-T, Lin Y-C, Yang A-J, Huang C-T, et al. HMG-CoA reductase inhibitors activate caspase-1 in human monocytes depending on ATP release and P2X7 activation. *J Leukoc Biol*. 2013 Feb;93(2):289–99.
316. Jinno H, Ueda M, Ozawa S, Ikeda T, Kitajima M, Maeda T, et al. The cytotoxicity of a conjugate composed of human epidermal growth factor and eosinophil cationic protein. *Anticancer Res*. 2002 Dec;22(6C):4141–5.
317. Sakakibara R, Hashida K, Kitahara T, Ishiguro M. Characterization of a unique nonsecretory ribonuclease from urine of pregnant women. *J Biochem (Tokyo)*. 1992 Mar;111(3):325–30.
318. Newton DL, Rybak SM. Unique Recombinant Human Ribonuclease and Inhibition of Kaposi’s Sarcoma Cell Growth. *J Natl Cancer Inst*. 1998 Dec 2;90(23):1787–91.

319. Chang C, Newton DL, Rybak SM, Wlodawer A. Crystallographic and functional studies of a modified form of eosinophil-derived neurotoxin (EDN) with novel biological activities. *J Mol Biol.* 2002 Mar 15;317(1):119–30.
320. Dricu A, Sergiu-Bogdan C, Brismar K, Biberfeld P, Andersson LC. A synthetic peptide derived from the human eosinophil-derived neurotoxin induces apoptosis in Kaposi's sarcoma cells. *Anticancer Res.* 2004 Jun;24(3a):1427–32.

## ANNEXES

Cette thèse comporte trois annexes, correspondant aux articles rédigés, où auquel j'ai participé, durant cette thèse.

### **ANNEXE 1: Involvement of eosinophils in the anti-tumor response**

Gatault S, Legrand F, Delbeke M, Loiseau S and Capron M.

Journal: Cancer Immunology Immunotherapy - Publié

Année: 2012

### **ANNEXE 2 : Interleukin-18 is involved in eosinophil-mediated tumoricidal activity against a colon carcinoma cell line by up regulating LFA-1 and ICAM-1**

Gatault S, Delbeke M, Driss V, Sarazin A, Kahn JE, Lefèvre G and Capron M.

Journal: Journal of Immunology – En reviewing favorable

Année: 2014

### **ANNEXE 3: Le polynucléaire éosinophile: nouveautés en physiologie et implications diagnostiques**

Prin L, Gatault S, Lefèvre G and Kahn JE.

Journal: Revue Francophone des Laboratoires - Publié

Année: 2014

## Involvement of eosinophils in the anti-tumor response

Solène Gatault<sup>1</sup>, Fanny Legrand<sup>1,\*</sup>, Marie Delbeke<sup>1</sup>, Sylvie Loiseau<sup>1</sup>, and Monique Capron<sup>1</sup>

<sup>1</sup> U995 Inserm, Université Lille 2, France

\* Present address: Laboratory of Parasitic Diseases, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA

**Corresponding Author :** Monique Capron. U995 Inserm- Université Lille 2 Faculté de Médecine Pôle Recherche 59800 Lille France ; Fax : 33(0)20 96 86 62 ; e-mail : monique.capron@univ-lille2.fr

### **Abstract**

Eosinophils have long been associated with allergy and parasitic infections. Today, they are considered as multifunctional leukocytes, which participate both in innate and adaptive immune response through the expression of various receptors and mediators. Although the tumor-associated eosinophilia is observed for a long time in many hematological and solid malignancies, with a generally good prognosis value, there is a lack of knowledge on the different mechanisms involved in this phenomenon. Moreover, the recent discovery in human eosinophils of different receptors and mediators, shared with lymphocytes and involved in anti-tumor defense, suggest that eosinophils can play a role in anti-tumoral immunity. We review in the present paper the current knowledge on epidemiology, recruitment and mechanisms involved in the response of eosinophils towards tumors.

**Keywords:** Eosinophils, AllergoOncology Symposium-in-Writing, Tumors, Cytotoxicity



## **Introduction**

Anti-tumor immunity, and particularly immune surveillance, implies both innate and adaptive immune responses from the peri-tumoral tissue microenvironment. These responses involve different cell types that can recognize stress ligands or antigens expressed by transformed cells. Although the majority of publications have focused on lymphocytes, natural killer cells, and dendritic cells, new cell types have emerged that appear to express tumoricidal activity, including eosinophils. While eosinophils are traditionally referred to as effector cells in allergic diseases and parasitic infections, their cytotoxic potential towards tumor cells has been reported in experimental models and in humans. Eosinophils, which express a specific arsenal of cytotoxic molecules, are observed in the peri-tumoral infiltrate of several types of cancers, including hematological malignancies and solid tumors [1]. This infiltration is called TATE for tumor-associated tissue eosinophilia, a term first used in 1981 [2]. This phenomenon has been observed in several types of cancers and is linked with a generally good prognostic value. The present paper summarizes epidemiological, in vivo and in vitro evidences that suggest the involvement of eosinophils in the anti-tumor response.

## **Biology of human eosinophils**

Eosinophils are produced in the bone marrow. They arise from a CD34-expressing myeloid progenitor under the influence of several transcription factors (GATA-1, PU.1, and CCAAT/enhancer binding protein) and cytokines (granulocyte macrophage colony-stimulating factor, interleukin [IL]-3, and IL-5). After completing a transitional shift in the blood, eosinophils are mainly found in tissues and particularly in the mucosal tissues where they form an interface with the environment (for example, in respiratory, gastrointestinal, or urogenital tracts). Long regarded as end-effectors in allergic diseases and parasitic infections involving helminths, eosinophils are now considered multifunctional leukocytes. They participate in the initiation and propagation of inflammatory responses, regulation of the immune response, and tissue homeostasis [3] through the production and

release of a large panel of cytokines and mediators, as well as the expression of surface receptors involved in innate and adaptive responses [4-8] (Fig. 1).

As summarized in reviews [3,8-10], eosinophils release an unusual arsenal of cytotoxic molecules depending on the type of stimulus. First, their granules contain highly cytotoxic preformed proteins: major basic protein (MBP), eosinophil cationic protein (ECP), eosinophil peroxidase (EPO), and eosinophil-derived neurotoxin (EDN). These basic proteins, which are selectively released upon activation, exert both cytotoxic properties and immunoregulatory functions. Human MBP is cytotoxic against helminths, some bacteria, tumor cells, and other mammalian cells, as it disrupts the integrity of lipid bilayers [11]. EPO, a member of the peroxidase family, kills a variety of microorganisms, parasites, and tumor cells in the presence of  $H_2O_2$  and halide. ECP and EDN express RNase activity, giving them antiviral and neurotoxic properties, in addition to their anti-bacterial and anti-helminthic activities. ECP reflects tissue cytotoxicity mediated by eosinophils. In fact, high levels of ECP are often observed during allergic asthma and allergic rhinitis. Their granules also contain Charcot-Leyden crystal protein, or galactin-10, which represents 7-10% of total protein of the eosinophil. Eosinophils are also able to produce other inflammatory mediators, including newly formed reactive oxygen species (ROS) and lipid mediators (e.g., leukotrienes, prostaglandins, and platelet-activating factor).

Eosinophils also have a role in the regulation of the immune response, through antigen presentation to T cells and the production and release of immunomodulatory molecules. They can internalize, process, and present antigenic peptides within the context of surface-expressed major histocompatibility complex II [12]. In addition, eosinophils have the capacity to provide costimulatory signals to T cells through the surface expression of molecules such as CD80, CD86, and CD40, and the ability to physically interact with  $CD4^+$  T cells [13]. Cytokines released by eosinophils may influence either tissue cells or immune cells [10]. Indeed, they produce profibrotic and angiogenic factors such as vascular endothelial growth factor, matrix metalloproteinases, transforming growth factors (TGF) alpha and beta, and nerve growth factor (NGF), which are involved in physiological and pathological tissue remodeling, as in asthma or nasal polyps. They also release a range of cytokines that may allow them to favor a Th1 response (IL-2, IL-12, interferon gamma) or, more frequently, a Th2 response (IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13 and IL-25). In addition, they secrete a variety of

chemokines, including RANTES (CCL5), eotaxin (CCL11), monocyte chemotactic protein 1 (CCL2), and macrophage inflammatory protein 1 alpha (MIP-1 $\alpha$ , also known as CCL3)[9,8]. EDN located in eosinophil granules has also been described as an immunoregulatory mediator that acts through the activation of Toll-like receptor 2 [14].

The cytotoxic potential of eosinophils may be beneficial against foreign targets or tumor cells, or harmful if directed against normal cells or tissues. Therefore, it would be reasonable to view the eosinophil as a multifaceted leukocyte that contributes to various physiological and pathological processes depending on their location and activation status [15].

### **Anatomopathological consequences of TATE**

Although the exact links between tissue eosinophilia and patients' outcomes remain to be established, many studies have attempted to assess the prognostic value of TATE in relation to the potential anti-tumor activity of eosinophils. Increased numbers of eosinophils have been associated with either good or poor prognosis, depending on the tumor type and stage of progression. However, conflicting results have been obtained because the criteria used to evaluate TATE vary widely among studies, and there is a lack of powerful statistical studies.

In 1983, Pretlow et al. studied the influence of eosinophil infiltration on the prognosis and development of metastases in patients with colon carcinoma [16]. Among 67 patients, those associated with strong eosinophil infiltration exhibited a significantly reduced incidence of metastasis (23.5% vs 62.0%), and patients with numerous eosinophils in peri-tumoral stromal tissues have better prognosis. Eighteen months after tumor resection, in patients without metastases, all patients with more eosinophils were still alive, in contrast to 73.7% of patients with fewer eosinophils [16]. Although these results are interesting, they are preliminary in nature, as revealed by the small number of patients ( $n=24$ ) and short follow-up period. Nevertheless, these data were confirmed in another study that included 126 patients. After five years of follow-up, patients with high eosinophil counts in tumor tissue exhibited significantly better prognosis than those with low counts [17]. In addition, this beneficial influence of eosinophils appears independent of other usual prognostic factors (e.g., stage,

age of the patients, histological grading, vascularization, vascular invasion, and neural invasion). The same conclusions were made in oral squamous cell carcinoma (SCC). Indeed, out of 125 patients with oral SCC, the presence of significant TATE is associated with a favorable prognosis and the role of tissue eosinophilia is independent of other prognostic factors such as age, sex, alcohol or tobacco consumption, tumor site, clinical stage, and vascular embolization [18]. The good prognostic value of tissue eosinophils has also been described in esophageal SCC by Ishibashi et al., who observed a significantly higher number of tissue eosinophils in cases without metastasis or clinical recurrence [19]. In nasopharyngeal carcinoma, the survival rate is better when tissue eosinophil infiltration is important, although the difference in survival rate is not statistically significant [20]. Interestingly, this difference becomes significant in the subgroup of patients with a poor prognosis, defined by the expression of epidermal growth factor receptor on tumor cells [20]. Regarding penile cancer, the presence of TATE has no influence on survival in patients with cancer at stages I and II (TNM classification). However, in advanced stages (III and IV), survival tends to be better in the stromal eosinophil-positive group than in the eosinophil-negative group (60% vs 0% at 5 years) [21]. An increase of tissue eosinophils has also been associated with good prognosis in laryngeal carcinoma, pulmonary adenocarcinoma, and bladder carcinoma [22]. Finally, although eosinophil infiltrates have been detected in tissues from the large majority of tumors, none have been observed in prostate cancer. However, eosinophil crystalloids have been detected at prostate tissue sites, and their presence has been inversely correlated with Gleason grade [23].

All of these data show that TATE is rather associated with a beneficial anti-tumor response, particularly in solid tumors. In contrast, TATE appears to be associated with poor prognosis in Hodgkin's lymphoma (HL), a disease in which inflammatory cells infiltrate the tumor, while the tumor cells, the Reed-Sternberg cells, constitute only a small percentage of the total tumor mass. Although various studies have investigated the relationship between TATE and HL, the most complete approach has been published by von Wasielewski et al. and concerns 1,511 HL biopsies [24]. Tissue eosinophilia was observed in 38% of cases, which differed among HL histology types: 0% in lymphocyte predominant, 14% in lymphocyte-rich classical, 40% to 55% in nodular sclerosis, 43% in mixed cellularity, and 54% in lymphocyte depleted. In a multivariate analysis, this study showed that

TATE is the strongest unfavorable prognostic factor for survival in nodular sclerosis HL. In contrary, no significant effect of eosinophilia on survival could be demonstrated in the mixed cellularity type [24]. Eosinophils secrete CD30-ligand [25]. The linkage of CD30-ligand to the CD30, present on Reed-Sternberg cells, is known to induce anti-apoptotic and proliferation signals [25]. But, the different clinical significance of eosinophilia between the histopathologic categories is not completely understood.

### **Recruitment of eosinophils at tumor sites**

The mechanisms that control the recruitment of eosinophils (which are predominantly present in tissues) to tumor sites have not been clearly established. Because eosinophils express many chemokine receptors on their surfaces, several chemotactic mediators may be involved in this migration. First, some tumor cells have been identified as a source of IL-5 and/or IL-3, factors that act on the medullary differentiation and migration of eosinophils. This is the case for cancers of the thyroid gland [26], liver [27], and bladder [28]. Another chemokine potentially involved in this recruitment is eotaxin, a potent and selective chemoattractant that acts on eosinophils. In humans, one of the first studies to report a correlation between increased recruitment of eosinophils and tissue expression of eotaxin (CCL11) was performed in HL. By contrast, no significant correlation was identified between TATE and levels of interferon gamma-induced protein 10 (IP-10, also known as CXCL10), RANTES, or MIP-1 $\alpha$ [29]. Eotaxin may not be secreted solely by tumor cells. In SCC of the oral cavity, the main source of eotaxin is eosinophils themselves [30], representing an autocrine and/or paracrine pathway for local eosinophil accumulation. It might also be envisaged that this chemokine contributes to the maintenance of tissue eosinophilia in these malignant tumors, rather than the initiation of their migration. Thielen et al. investigated the relationships between different chemokines and TATE in 50 cases of peripheral T cell lymphoma. They demonstrated a significant correlation between intra-tumoral eosinophils and the expression of IL-5 and TARC (CCL17), but not between RANTES or eotaxin and TATE [31]. Investigations of eosinophil localization at tumor sites may also help add to understanding their recruitment. Eosinophils may act as part of the innate response in anti-tumor

immunity, particularly by recognizing damage-associated molecular pattern (DAMP) molecules, which are typically released after necrotic tumor death. Neoplastic tissues undergoing necrosis induce eosinophil migration in vitro and in vivo [32,33]. Cormier et al. have demonstrated that the infiltration of tumors by eosinophils is an early, persistent, spatially restricted response. After subcutaneous injection of melanoma cells into mice, significant eosinophilia occurs within necrotic and capsule (fibrous acellular) regions compared with areas of viable tumor cells [32]. Quantitative assessment of eosinophil recruitment in solid tumors has shown that tissue infiltration by eosinophils is mediated by factors (e.g., DAMPs) released directly from necrotic tumor tissues [34]. All of these data suggest that DAMPs or alarmins act in anti-tumor immunity by recruiting and activating eosinophils into the tumor. One such molecule is high-mobility group box 1 (HMGB1). This possible role of this factor is likely for several reasons. First, HMGB1 is released from necrotic but not from apoptotic tumor cells [35]. Next, Lofti et al. showed that eosinophils express the receptor for advanced glycation end products (RAGE), one of the first defined receptors for HMGB1, and that this alarmin acts as a chemoattractant for these cells and induces their degranulation [36]. Notably, IL-33 (another alarmin) may also act in this context. Indeed, serum IL-33 is increased in gastric cancer [37], and IL-33 has been shown to recruit eosinophils in vivo [38]. Taken together, chemoattractant factors influencing the migration of eosinophils in areas of tumor development appear to depend on the cancer type and stage.

### **Tumoricidal properties of eosinophils**

Although TATE is often associated with favorable prognostic value, little is known about the exact role of eosinophils in anti-tumor responses. Eosinophils are multifunctional leukocytes involved in cytotoxicity, inflammatory processes, tissue remodeling, and the modulation of innate and adaptive immunity. Their frequent state of degranulation in close proximity to the tumor [39] suggests that their cytotoxic potential might be linked to the reduction of tumor growth. Reports of immunotherapeutic approaches and recent in vitro and in vivo studies suggest that eosinophils are involved in tumoricidal activity.

## Immunotherapy

Eosinophilia is frequently observed during immunotherapy protocols, particularly with IL-2 [40,41] or IL-4 [42,43]. The impact of eosinophil infiltration on therapeutic efficiency remains unclear.

Interleukin-2 immunotherapy is used to treat certain types of cancers, such as melanoma or renal carcinoma. The association of the anti-tumor efficacy of systemic IL-2 administration with the presence of degranulated eosinophils within the tumor suggests that eosinophils may play an effective role in the anti-tumor response [40,41]. Several hypotheses have been advanced to explain this association. First, eosinophils may induce direct tumor lysis in an innate manner. Huland et al. showed that eosinophils release their toxic granules on bladder cancer cells after treatment with IL-2 [40]. Alternatively, antibody-dependent mechanisms of eosinophil activation may also be involved [44], as well as the ability of eosinophils to modulate the tumor microenvironment through their immuno-regulatory properties. However, despite the anti-tumor properties of eosinophils, the prognosis of intratumoral eosinophilia observed in IL-2-treated-patients has not been sufficiently explored thus far.

Concerning immunotherapy with IL-4, studies in mouse models have suggested a link between eosinophils and scores of therapeutic anti-tumor responses [43]. Phase 1 clinical trials have demonstrated that administering IL-4 to patients with cancer induced eosinophil degranulation in a dose-dependent manner, based on increased levels of MBP in serum and urine [42].

More recently, it has been demonstrated that IL-25 (or IL-17E) has antitumor potential in vivo. In fact, administration of IL-25 showed some efficacy in the treatment of human melanoma, pancreatic, lung, colon, and breast cancer xenograft models [45]. The results demonstrated that IL-17E treatment leads to eosinophilia, which is correlated with tumor inhibition [45]. However, the link between immunotherapeutic anti-tumor efficacy and eosinophilia is mainly based on correlation analysis, and no conclusions can be drawn regarding the mechanism of action of eosinophils in the modulation of tumor growth.

## In vivo data

Several in vivo studies suggest a link between tumor eradication and eosinophil recruitment. In 1992, Tepper et al. showed that mouse tumor cells that were engineered to produce IL-4 by transfection exhibited reduced or absent tumorigenicity when reintroduced into animals. The injection of malignant cells induced a tumor infiltrate composed predominantly of eosinophils and macrophages, and the role of eosinophils in IL-4-mediated tumor cytotoxicity was clearly evidenced in this model [43]. Later, in a cytotoxic T lymphocyte-resistant mouse melanoma model, the clearance of lung metastases by Th2 lymphocytes was under the control of eotaxin and signal transducer and activator of transcription 6 (STAT6). The eradication of these metastases is associated with an influx of degranulated eosinophils into the tumors [46]. Although the incubation of eosinophils with B16 melanoma cells revealed no lysis of these tumor cells, the cytotoxicity of eosinophil lysates was demonstrated. Furthermore, immunohistochemical staining detected eosinophil-derived MBP in sections containing lung metastases [46]. Therefore, it appears that the tumor microenvironment may provide additional signals for eosinophil degranulation and tumor destruction. Nevertheless, one limit of these models is the use of cytokine- or OVA-expressing malignant cells to facilitate the development of a Th2 response. Using a different model with unmanipulated tumor cells in wild-type mice, Cormier et al. investigated eosinophil function in a more natural setting and showed that the infiltration of tumors by eosinophils is an early and persistent response [32]. In another study, Simson et al. investigated the role of eosinophils in tumor immune surveillance in several genetically modified mouse models of fibrosarcoma. When they used IL-5 transgenic mice, which expressed high eosinophil counts, a significant reduction in tumor establishment and growth was demonstrated. This result was significantly correlated with a high level of eosinophil recruitment to the tumor and surrounding connective tissue. By contrast, elevated tumor incidence and reduced influx of eosinophils into tumors was observed when they used mice with lower eosinophils counts (*CCL11*<sup>-/-</sup> mice), as well as in eosinophil-deficient *IL-5/CCL11*<sup>-/-</sup> and  $\Delta$ *dbl* *GATA* mice [47]. Taken together, these results



indicate that a Th2-type response involving eosinophils is associated to tumor eradication in several animal models.

#### In vitro data

Such in vivo experiments indicated a role for eosinophils in anti-tumor immunity; however, the mechanisms involved remain misunderstood. Although limited, in vitro data provide some answers. Recently, the demonstration that eosinophils express receptors and mediators shared with cytotoxic T cells (which are known to be involved in the anti-tumor response) provides additional arguments favoring the potential tumoricidal role of eosinophils. Munitz et al. showed that eosinophils express functional 2B4, a receptor that belongs to the CD2 subfamily of the immunoglobulin superfamily and is also expressed by T cells [7]. The activation of eosinophils through 2B4 leads to cytotoxicity against two malignant cell lines, the mouse mastocytoma P815 and EBV-infected 721.221 B cell lines [7]. More recently, our own studies revealed the expression of another receptor shared with T cells, the  $\gamma\delta$ TCR/CD3 complex [6]. The  $\gamma\delta$  T lymphocytes are centrally involved in the defense against cancer, and phosphoantigens (ligands of the  $\gamma\delta$ TCR) are expressed by many tumor cells. The  $\gamma\delta$ TCR/CD3-mediated activation of human eosinophils induced ROS production and the release of cytotoxic granule proteins, confirming that this receptor was functional. Human eosinophils were able to induce apoptosis and necrosis in the Colo-205 colon carcinoma cell line [6,5]. These data, which suggest that eosinophils have tumoricidal properties, led us to further investigate the interactions of eosinophils with these tumor cells. Close contact between eosinophils and tumor cells is essential to induce cytotoxicity, as demonstrated by the role of adhesion molecules CD11a/CD18 in this cytolytic process [5], as well as by electron microscopy studies [39]. These studies provide evidence that crosstalk exists between eosinophils and viable tumor cells. Mediators involved in the anti-tumor response include ECP, EDN, and tumor necrosis factor (which are produced by eosinophils), as well as granzyme A. This mediator, which is classically associated with cytotoxic T cells, was recently identified in eosinophils, and acts synergistically with the cytotoxic granule ECP [5]. These in vitro

data suggest that through receptors and mediators involved in tumor cell cytotoxicity, eosinophils participate in the anti-tumor response.

## **AllergoOncology**

The ongoing debate regarding the relationship between allergy and cancer is not new, and remains valid. Two general hypotheses can be considered: allergic inflammation enhances tumor immunosurveillance, making it more efficient, or alters the functioning of the immune system, promoting tumor development.

First, epidemiological studies have attempted to demonstrate an association between a history of IgE-mediated allergy and cancer. These studies have been summarized in recent reviews [48,49]. Although the results are not entirely clear, there is some evidence to suggest the existence of possible inverse relationships. For instance, experiments conducted in IL-5 transgenic mice demonstrated that TATE is associated with tumor suppression, and not with increased vascularity or tumor progression [47]. This finding suggests that eosinophils may exert anti-tumor functions in an IL-5-rich environment (e.g., allergies). Moreover, our own studies showed that eosinophils from allergic donors induced significantly increased apoptosis of tumor cells compared with eosinophils purified from normal donors (Fig. 2) [5], suggesting efficient *in vivo* priming of eosinophils in allergic patients. Such heterogeneity of eosinophil-mediated tumor cytotoxicity led to the suggestion that the response to tumor development may be more efficient in allergic patients, with a potential tumor sensing role for IgE [50]. Eosinophils express both low-affinity and high-affinity receptors for IgE (FcεRI), and surface IgE is detected on eosinophils from allergic patients [51]. Therefore, an antibody-dependent cell-mediated toxicity mechanism towards tumor cells via surface IgE might be involved, as has been shown regarding parasitic targets [52]. The possible participation of IgE together with eosinophils in mechanisms of cytotoxicity directed against tumor cells requires investigation.

In addition to IgE- or IL-5-related processes, it must be noted that the existence of a gene polymorphism in ECP leads to the production of ECPArg97. The presence of this mutated ECP is

associated with the occurrence of allergic symptoms [53] and HL nodular sclerosing [54]. A correlation between the ECP Arg97 and allergic symptoms [53] and the development of fibrosis in lymphoma [54] support an altered biological function for ECP depending on genotype. Although limited, these epidemiological, experimental and genetic approaches suggest a relationship between allergy and cancer, which need to be further investigated.

## **Summary and perspectives**

Altogether, these studies indicate that eosinophils, whose function has long been restricted to an effector activity in parasitic infections or allergic diseases, likely play a role in innate defense and anti-tumor surveillance, acting synergistically with other effectors. Eosinophils are capable of integrating danger signals and responding quickly and selectively. Although the *in vivo* relevance of these new features attributable to eosinophils remains to be demonstrated, their tissue location, possible recruitment within many tumors, and their well-known cytotoxic potential are all arguments that support a potential role for eosinophils as an effector in the antitumor response. Further studies are needed especially to decipher the molecular interactions between eosinophils and tumors, in different preclinical and clinical situations. These results could lead to consider new therapeutic perspectives, including the activation of eosinophils via the stimulation of some of eosinophils receptors by their agonists.

## **Conflicts of interest**

The authors declare that they have no conflicts of interest.

## **Abbreviation List**

DAMP	Damage-associated molecular pattern molecule
ECP	Eosinophil cationic protein

EDN	Eosinophil-derived neurotoxin
EPO	Eosinophil peroxidase
HL	Hodgkin's Lymphoma
HMGB1	High-mobility group box 1
IL	Interleukin
MBP	Major basic protein
RAGE	Receptor for advanced glycation end products
ROS	Reactive oxygen species
SCC	Squamous cell carcinoma
TATE	Tumor-associated tissue eosinophilia

## References

1. Munitz A, Levi-Schaffer F (2004) Eosinophils: 'new' roles for 'old' cells. *Allergy* 59 (3):268-275
2. Lowe D, Jorizzo J, Hutt MS (1981) Tumour-associated eosinophilia: a review. *J Clin Pathol* 34 (12):1343-1348
3. Kita H (2011) Eosinophils: multifaceted biological properties and roles in health and disease. *Immunol Rev* 242 (1):161-177
4. Driss V, Legrand F, Hermann E, Loiseau S, Guerardel Y, Kremer L, Adam E, Woerly G, Dombrowicz D, Capron M (2009) TLR2-dependent eosinophil interactions with mycobacteria: role of alpha-defensins. *Blood* 113 (14):3235-3244
5. Legrand F, Driss V, Delbeke M, Loiseau S, Hermann E, Dombrowicz D, Capron M (2010) Human eosinophils exert TNF-alpha and granzyme A-mediated tumoricidal activity toward colon carcinoma cells. *J Immunol* 185 (12):7443-7451
6. Legrand F, Driss V, Woerly G, Loiseau S, Hermann E, Fournie JJ, Heliot L, Mattot V, Soncin F, Gougeon ML, Dombrowicz D, Capron M (2009) A functional gammadeltaTCR/CD3 complex distinct from gammadeltaT cells is expressed by human eosinophils. *PLoS One* 4 (6):e5926
7. Munitz A, Bachelet I, Fraenkel S, Katz G, Mandelboim O, Simon HU, Moretta L, Colonna M, Levi-Schaffer F (2005) 2B4 (CD244) is expressed and functional on human eosinophils. *J Immunol* 174 (1):110-118
8. Rothenberg ME, Hogan SP (2006) The eosinophil. *Annu Rev Immunol* 24:147-174
9. Gleich GJ (2000) Mechanisms of eosinophil-associated inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 105 (4):651-663
10. Hogan SP, Rosenberg HF, Moqbel R, Phipps S, Foster PS, Lacy P, Kay AB, Rothenberg ME (2008) Eosinophils: biological properties and role in health and disease. *Clin Exp Allergy* 38 (5):709-750
11. Abu-Ghazaleh RI, Gleich GJ, Prendergast FG (1992) Interaction of eosinophil granule major basic protein with synthetic lipid bilayers: a mechanism for toxicity. *J Membr Biol* 128 (2):153-164
12. Lucey DR, Nicholson-Weller A, Weller PF (1989) Mature human eosinophils have the capacity to express HLA-DR. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86 (4):1348-1351
13. Spencer LA, Weller PF (2010) Eosinophils and Th2 immunity: contemporary insights. *Immunol Cell Biol* 88 (3):250-256
14. Yang D, Chen Q, Su SB, Zhang P, Kurosaka K, Caspi RR, Michalek SM, Rosenberg HF, Zhang N, Oppenheim JJ (2008) Eosinophil-derived neurotoxin acts as an alarmin to activate the TLR2-MyD88 signal pathway in dendritic cells and enhances Th2 immune responses. *J Exp Med* 205 (1):79-90
15. Lee JJ, Jacobsen EA, McGarry MP, Schleimer RP, Lee NA (2010) Eosinophils in health and disease: the LIAR hypothesis. *Clin Exp Allergy* 40 (4):563-575

16. Pretlow TP, Keith EF, Cryar AK, Bartolucci AA, Pitts AM, Pretlow TG, 2nd, Kimball PM, Boohaker EA (1983) Eosinophil infiltration of human colonic carcinomas as a prognostic indicator. *Cancer Res* 43 (6):2997-3000
17. Fernandez-Acenero MJ, Galindo-Gallego M, Sanz J, Aljama A (2000) Prognostic influence of tumor-associated eosinophilic infiltrate in colorectal carcinoma. *Cancer* 88 (7):1544-1548
18. Dorta RG, Landman G, Kowalski LP, Lauris JR, Latorre MR, Oliveira DT (2002) Tumour-associated tissue eosinophilia as a prognostic factor in oral squamous cell carcinomas. *Histopathology* 41 (2):152-157
19. Ishibashi S, Ohashi Y, Suzuki T, Miyazaki S, Moriya T, Satomi S, Sasano H (2006) Tumor-associated tissue eosinophilia in human esophageal squamous cell carcinoma. *Anticancer Res* 26 (2B):1419-1424
20. Fujii M, Yamashita T, Ishiguro R, Tashiro M, Kameyama K (2002) Significance of epidermal growth factor receptor and tumor associated tissue eosinophilia in the prognosis of patients with nasopharyngeal carcinoma. *Auris Nasus Larynx* 29 (2):175-181
21. Ono Y, Ozawa M, Tamura Y, Suzuki T, Suzuki K, Kurokawa K, Fukabori Y, Yamanaka H (2002) Tumor-associated tissue eosinophilia of penile cancer. *Int J Urol* 9 (2):82-87
22. Costello R, O'Callaghan T, Sebahoun G (2005) [Eosinophils and antitumour response]. *Rev Med Interne* 26 (6):479-484
23. Luna-More S, Florez P, Ayala A, Diaz F, Santos A (1997) Neutral and acid mucins and eosinophil and argyrophil crystalloids in carcinoma and atypical adenomatous hyperplasia of the prostate. *Pathol Res Pract* 193 (4):291-298
24. von Wasielewski R, Seth S, Franklin J, Fischer R, Hubner K, Hansmann ML, Diehl V, Georgii A (2000) Tissue eosinophilia correlates strongly with poor prognosis in nodular sclerosing Hodgkin's disease, allowing for known prognostic factors. *Blood* 95 (4):1207-1213
25. Pinto A, Aldinucci D, Gloghini A, Zagonel V, Degan M, Improta S, Juzbasic S, Todesco M, Perin V, Gattei V, Herrmann F, Gruss HJ, Carbone A (1996) Human eosinophils express functional CD30 ligand and stimulate proliferation of a Hodgkin's disease cell line. *Blood* 88 (9):3299-3305
26. Geisinger KR, Steffee CH, McGee RS, Woodruff RD, Buss DH (1998) The cytomorphologic features of sclerosing mucoepidermoid carcinoma of the thyroid gland with eosinophilia. *Am J Clin Pathol* 109 (3):294-301
27. Fridlender ZG, Simon HU, Shalit M (2003) Metastatic carcinoma presenting with concomitant eosinophilia and thromboembolism. *Am J Med Sci* 326 (2):98-101
28. Dibbert B, Daigle I, Braun D, Schranz C, Weber M, Blaser K, Zangemeister-Wittke U, Akbar AN, Simon HU (1998) Role for Bcl-xL in delayed eosinophil apoptosis mediated by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-5. *Blood* 92 (3):778-783

29. Teruya-Feldstein J, Jaffe ES, Burd PR, Kingma DW, Setsuda JE, Tosato G (1999) Differential chemokine expression in tissues involved by Hodgkin's disease: direct correlation of eotaxin expression and tissue eosinophilia. *Blood* 93 (8):2463-2470
30. Lorena SC, Oliveira DT, Dorta RG, Landman G, Kowalski LP (2003) Eotaxin expression in oral squamous cell carcinomas with and without tumour associated tissue eosinophilia. *Oral Dis* 9 (6):279-283
31. Thielen C, Radermacher V, Trimeche M, Roufosse F, Goldman M, Boniver J, de Leval L (2008) TARC and IL-5 expression correlates with tissue eosinophilia in peripheral T-cell lymphomas. *Leuk Res* 32 (9):1431-1438
32. Cormier SA, Taranova AG, Bedient C, Nguyen T, Protheroe C, Pero R, Dimina D, Ochkur SI, O'Neill K, Colbert D, Lombardi TR, Constant S, McGarry MP, Lee JJ, Lee NA (2006) Pivotal Advance: eosinophil infiltration of solid tumors is an early and persistent inflammatory host response. *J Leukoc Biol* 79 (6):1131-1139
33. Stenfeldt AL, Wenneras C (2004) Danger signals derived from stressed and necrotic epithelial cells activate human eosinophils. *Immunology* 112 (4):605-614
34. Lotfi R, Lee JJ, Lotze MT (2007) Eosinophilic granulocytes and damage-associated molecular pattern molecules (DAMPs): role in the inflammatory response within tumors. *J Immunother* 30 (1):16-28
35. Ito N, DeMarco RA, Mailliard RB, Han J, Rabinowich H, Kalinski P, Stolz DB, Zeh HJ, 3rd, Lotze MT (2007) Cytolytic cells induce HMGB1 release from melanoma cell lines. *J Leukoc Biol* 81 (1):75-83
36. Lotfi R, Herzog GI, DeMarco RA, Beer-Stolz D, Lee JJ, Rubartelli A, Schrezenmeier H, Lotze MT (2009) Eosinophils oxidize damage-associated molecular pattern molecules derived from stressed cells. *J Immunol* 183 (8):5023-5031
37. Sun P, Ben Q, Tu S, Dong W, Qi X, Wu Y (2011) Serum interleukin-33 levels in patients with gastric cancer. *Dig Dis Sci* 56 (12):3596-3601
38. Ikutani M, Yanagibashi T, Ogasawara M, Tsuneyama K, Yamamoto S, Hattori Y, Kouro T, Itakura A, Nagai Y, Takaki S, Takatsu K (2011) Identification of Innate IL-5-Producing Cells and Their Role in Lung Eosinophil Regulation and Antitumor Immunity. *J Immunol* 188 (2):703-13
39. Caruso RA, Parisi A, Quattrocchi E, Scardigno M, Branca G, Parisi C, Luciano R, Paparo D, Fedele F (2011) Ultrastructural descriptions of heterotypic aggregation between eosinophils and tumor cells in human gastric carcinomas. *Ultrastruct Pathol* 35 (4):145-149
40. Huland E, Huland H (1992) Tumor-associated eosinophilia in interleukin-2-treated patients: evidence of toxic eosinophil degranulation on bladder cancer cells. *J Cancer Res Clin Oncol* 118 (6):463-467

41. Simon HU, Plotz S, Simon D, Seitzer U, Braathen LR, Menz G, Straumann A, Dummer R, Levi-Schaffer F (2003) Interleukin-2 primes eosinophil degranulation in hypereosinophilia and Wells' syndrome. *Eur J Immunol* 33 (4):834-839
42. Sosman JA, Bartemes K, Offord KP, Kita H, Fisher SG, Kefer C, Ellis TA, Fisher RI, Higgins TJ, Gleich GJ (1995) Evidence for eosinophil activation in cancer patients receiving recombinant interleukin-4: effects of interleukin-4 alone and following interleukin-2 administration. *Clin Cancer Res* 1 (8):805-812
43. Tepper RI, Coffman RL, Leder P (1992) An eosinophil-dependent mechanism for the antitumor effect of interleukin-4. *Science* 257 (5069):548-551
44. Rivoltini L, Viggiano V, Spinazze S, Santoro A, Colombo MP, Takatsu K, Parmiani G (1993) In vitro anti-tumor activity of eosinophils from cancer patients treated with subcutaneous administration of interleukin 2. Role of interleukin 5. *Int J Cancer* 54 (1):8-15
45. Benatar T, Cao MY, Lee Y, Lightfoot J, Feng N, Gu X, Lee V, Jin H, Wang M, Wright JA, Young AH (2010) IL-17E, a proinflammatory cytokine, has antitumor efficacy against several tumor types in vivo. *Cancer Immunol Immunother* 59 (6):805-817
46. Mattes J, Hulett M, Xie W, Hogan S, Rothenberg ME, Foster P, Parish C (2003) Immunotherapy of cytotoxic T cell-resistant tumors by T helper 2 cells: an eotaxin and STAT6-dependent process. *J Exp Med* 197 (3):387-393
47. Simson L, Ellyard JI, Dent LA, Matthaai KI, Rothenberg ME, Foster PS, Smyth MJ, Parish CR (2007) Regulation of carcinogenesis by IL-5 and CCL11: a potential role for eosinophils in tumor immune surveillance. *J Immunol* 178 (7):4222-4229
48. Turner MC, Chen Y, Krewski D, Ghadirian P (2006) An overview of the association between allergy and cancer. *Int J Cancer* 118 (12):3124-3132
49. Wang H, Diepgen TL (2005) Is atopy a protective or a risk factor for cancer? A review of epidemiological studies. *Allergy* 60 (9):1098-1111
50. Jensen-Jarolim E, Achatz G, Turner MC, Karagiannis S, Legrand F, Capron M, Penichet ML, Rodriguez JA, Siccardi AG, Vangelista L, Riemer AB, Gould H (2008) AllergoOncology: the role of IgE-mediated allergy in cancer. *Allergy* 63 (10):1255-1266
51. Tomassini M, Tsicopoulos A, Tai PC, Gruart V, Tonnel AB, Prin L, Capron A, Capron M (1991) Release of granule proteins by eosinophils from allergic and nonallergic patients with eosinophilia on immunoglobulin-dependent activation. *J Allergy Clin Immunol* 88 (3 Pt 1):365-375
52. Gounni AS, Lamkhioed B, Ochiai K, Tanaka Y, Delaporte E, Capron A, Kinet JP, Capron M (1994) High-affinity IgE receptor on eosinophils is involved in defence against parasites. *Nature* 367 (6459):183-186



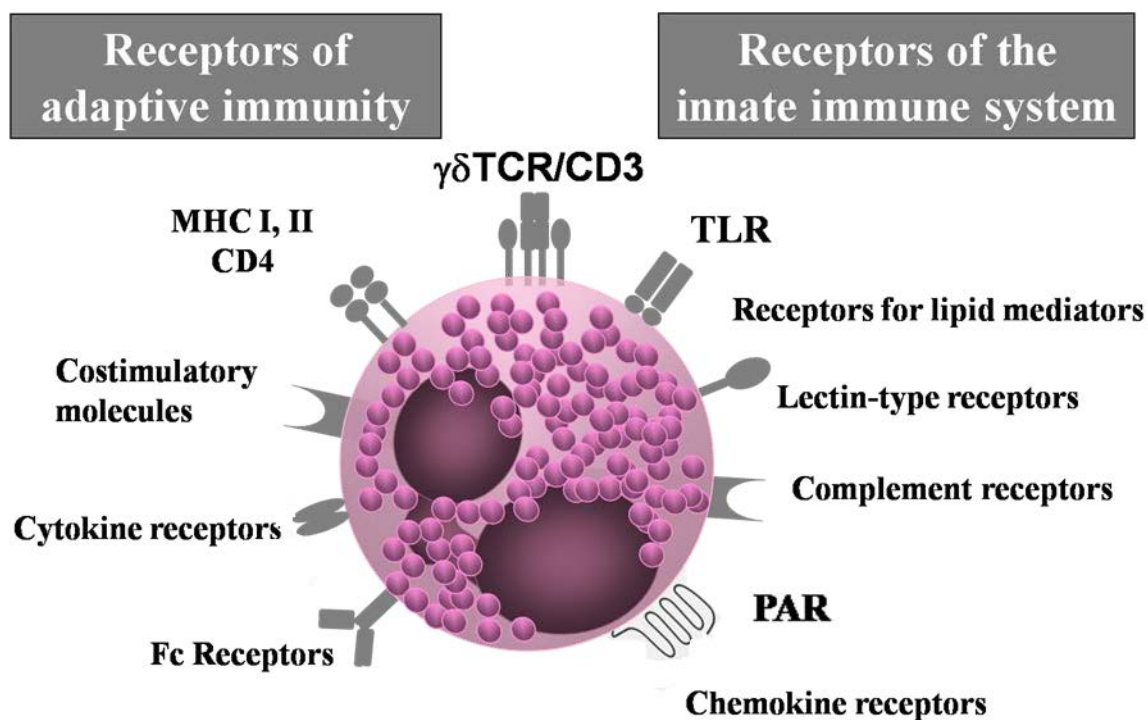
53. Jonsson UB, Bystrom J, Stalenheim G, Venge P (2002) Polymorphism of the eosinophil cationic protein-gene is related to the expression of allergic symptoms. *Clin Exp Allergy* 32 (7):1092-1095
54. Molin D (2004) Bystander cells and prognosis in Hodgkin lymphoma. Review based on a doctoral thesis. *Ups J Med Sci* 109 (3):179-228

Figure 1: Schematic representation of main receptors, present on eosinophils, implicated in innate and/or adaptive immunity. Eosinophils express receptors of innate immunity such as TLR (-1, -2, -4, -5, -6, -7, -9), PAR (-1, -2), receptors for lipid mediators (leukotrienes, platelet activating factor, prostaglandin), anaphylatoxin receptors and chemokine receptors (CCR1, CCR2, CCR3, CXCR3). Receptors of adaptive immunity are Fc receptors (IgE, IgA and IgG), MHC I and II, costimulatory molecules (CD86, CD40, CD40L, CD28), cytokine receptors as well as the TCR $\gamma\delta$ /CD3 complex, a link between innate and adaptive immunity.

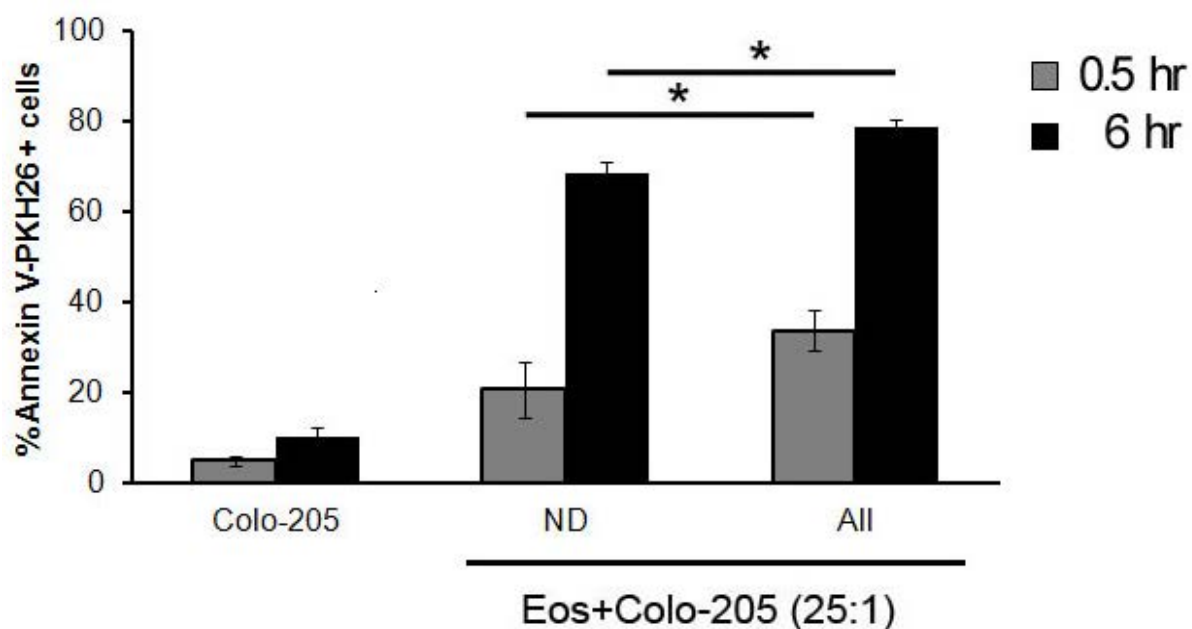
TLR: Toll Like Receptors; MHC: Major Histocompatibility Complex; PAR: Protease Activated Receptors

Figure 2: Cytotoxic potential of human eosinophils purified from Normal Donors (n=6) or Allergic patients (n=4) towards the colon carcinoma cells Colo-205. Colo-205 were stained with PKH-26. Eosinophils-induced tumor cell death was performed by Annexin V staining after 0.5 and 6 h coincubation with eosinophils. Eosinophils from allergic donors displayed exacerbated cytotoxicity compared to those from normal donors. (\*= p<0.05)

**Figure 1**



**Figure 2**



Full Title: Interleukin-18 is involved in eosinophil-mediated tumoricidal activity against a colon carcinoma cell line by up regulating LFA-1 and ICAM-1

Running Title: IL-18 in eosinophil antitumor activity

Authors: Solène Gatault<sup>\*</sup>, Marie Delbeke<sup>\*</sup>, Virginie Driss<sup>\*</sup>, Aurore Sarazin<sup>\*</sup>, Jean-Emmanuel Kahn<sup>†,‡</sup>, Guillaume Lefèvre<sup>‡§</sup>, and Monique Capron<sup>\*</sup>

Affiliations :

<sup>\*</sup> Inserm U995, Université de Lille, Institut Fédératif de Recherche 114, 1 place Verdun, 59045 Lille, France

<sup>†</sup> Service de Médecine Interne, Hôpital Foch, Université Versailles Saint Quentin en Yvelines, 40 rue Worth, 92150 Suresnes, France

<sup>‡</sup> French Eosinophil Network, EA2686, Université de Lille, Lille, France

<sup>§</sup> Institut d'immunologie, Service de médecine interne, Unité d'immunologie clinique, Centre Hospitalier Régional Universitaire de Lille, 1 place verdun, 59045 Lille, France

Corresponding author: Dr. Solène Gatault

- Phone number : +33(0)3-20-62-68-61
- Fax number : +33(0)3-20-62-68-93
- Email adress : solene.gatault@hotmail.fr

## Abstract

Eosinophils are multifunctional leukocytes, involved in innate and adaptive immune responses through the expression of various receptors and mediators. Previously, we showed that human eosinophils and T cells shared cytotoxic activities against tumor cells, which involved gamma-delta TCR and cell-cell contact. In this study, we investigated the molecules involved in eosinophil-tumor cell interactions. Given the role of IL-18 in cell adhesion and in protecting against colon cancer, we evaluated its role in eosinophil-mediated cytotoxicity against Colo-205, a human colon carcinoma cell line. We found that human eosinophils exerted dose- and time-dependent tumoricidal activity against Colo-205 cells. Neutralization of IL-18 significantly reduced eosinophil-mediated Colo-205 apoptosis and it inhibited cell-cell adhesion. Moreover, addition of recombinant IL-18 led to up-regulation of CD11a, and ICAM-1 adhesion molecules, which were involved in the contact between eosinophils and Colo-205 cells. Our results indicated that IL-18 was involved in eosinophil-mediated death of Colo-205, by facilitating contact between effector and target cells. These data underlined the involvement of an additional mediator in eosinophil-mediated antitumor cytotoxicity. Our findings supported existing evidence that eosinophils could play a beneficial role in the context of colon cancer.

## **Introduction**

Eosinophils are multifunctional leukocytes, which participate in innate and adaptive immune responses through the expression of various receptors and mediators (1). Although indirect, growing evidence has supported the participation of eosinophils in anti-tumor immunity, notably in the context of colon cancer (2, 3). Several epidemiological studies have suggested a correlation between the presence of tumor-associated tissue eosinophilia (TATE) and colorectal carcinoma, and that correlation showed good prognostic value (4–7). TATE was considered as an independent prognostic indicator; thus, increasing eosinophil counts indicated increasing survival (5, 6). Recently, we and others have shown that human eosinophils expressed receptors and mediators that were shared with lymphocytes and were involved in anti-tumor defense, such as 2B4, TCR $\gamma\delta$ /CD3 complex, and granzyme A (8–10). Eosinophil stimulation through these receptors induced tumor cell death *in vitro*.

IL-18 is a member of the IL-1 family of cytokines. IL-18 was first identified as an IFN $\gamma$ -inducing factor, based on its ability to enhance the Th1-type immune response by stimulating NK cells and T cells (11). Upon binding to the specific IL-18 receptor complex (IL-18R), IL-18 stimulates a wide range of immune cells, including CD4<sup>+</sup> T cells (12), CD8<sup>+</sup> T cells (13), NK cells (14),  $\gamma\delta$  T cells (15), neutrophils (16), and eosinophils (17). This activity results from the induction of Fas ligand production and the generation of multiple secondary proinflammatory cytokines, chemokines, cell adhesion molecules, and NO species (18). Several reports have shown that recombinant IL-18 exerted potent anti-tumor effects in animal models of melanoma, lymphoma, sarcoma, and carcinoma (18–22). In those models, systemic IL-18 administration or IL-18 gene transfer inhibited tumor growth and prolonged the survival of tumor-bearing mice. In particular, IL-18 appeared to play a major role in intestinal homeostasis and defense against colon cancer (24). First, *in vitro*, IL-18 enhanced NK cell-mediated death of MC38 cells, a murine colon carcinoma cell line (14). Second, *in*

*vivo*, *il18*<sup>-/-</sup> mice showed a higher frequency of tumor growth compared to wild type (WT) mice (25, 26). Finally, administration of recombinant IL-18 or an *in vivo* IL-18 gene transfer led to immune rejection of colon tumors in mice (19, 27–29).

The anti-tumor properties of IL-18 involves NK cells and cytotoxic CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells (30). However, to our knowledge, the effects of IL-18 on eosinophil-mediated cytotoxicity have not been reported previously. Cell-cell contacts are one of the main forms of communication between immune cells and cancer cells. In this context, IL-18 effects on tumor cells required direct contact between effector cells and target cells (14). Similarly, the effects of cytotoxic eosinophils on colon carcinoma cells depends on LFA-1 (CD11a/CD18)-mediated cell-cell contact (9). In the present study, we investigated further the human eosinophil-mediated cytotoxicity against Colo-205 cells and we showed that IL-18 was involved in the antitumor properties of eosinophils against Colo-205 cells, in particular, by promoting cell-cell contact between these two cell types.

## **Materials and Methods**

### *Eosinophil purification*

After participants provided informed consent, peripheral venous blood was collected from normal donors (ND), allergic donors (All), or patients with hypereosinophilic syndrome (HES; Clinical trials.gov identifier: NCT01713504). Human eosinophils were isolated as previously described (31) on a Percoll gradient (GE Healthcare, Uppsala, Sweden), followed by negative immunomagnetic selection with anti-CD16-coated microbeads (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Germany). Purification was optimized when necessary by adding anti-CD2, anti-CD19, and anti-CD14-coated microbeads (Miltenyi Biotech). Eosinophil purity was assessed by staining cytopsin preparations with May–Grünwald–Giemsa (MGG); the purity was >98%. Eosinophils were cultured overnight at 37 °C in 5% CO<sub>2</sub>. The culture medium comprised RPMI 1640, without phenol red, supplemented with 10% FCS, 25 mM HEPES buffer, 2 mM L-glutamine, 10 mM sodium pyruvate, and 10 µg/ml gentamycin (Life Technologies, Grand Island, NY); hereafter, this medium is called complete medium.

### *Cell lines*

The Colo-205 cell line (human colon carcinoma) was purchased from American Type Culture Collection (ATCC; Manassas, VA). We obtained the T24 (human urinary bladder carcinoma) and L428 (Hodgkin lymphoma) cell lines from Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellculturen (DSMZ; Braunschweig, Germany). HBL cells (LOCE-MM001) (human melanoma cell line) were provided by Pr G. Ghanem (L.O.C.E., Brussels, Belgium). Cells were grown at 37 °C in 5% CO<sub>2</sub> in either RPMI 1640 or in DMEM supplemented with 10% FCS, 25 mM HEPES buffer, 2 mM L-glutamine, 10 mM sodium pyruvate, and 10 µg/ml gentamycin (Life Technologies).

### *Cytotoxicity assays*



Tumor cell lines were first stained with PKH26 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) according to the manufacturer's recommendations. Eosinophil-mediated cytotoxicity against PHK26-labeled cell lines was measured in complete medium at different effector:target (E:T) ratios and at different time points. Apoptosis was assessed after staining cells with Annexin V-FITC (Miltenyi Biotech) for 15 min at room temperature. Apoptosis and necrosis were distinguished by performing an additional staining with propidium iodide (Miltenyi Biotech). Analyses were performed on a BD Accuri<sup>TM</sup> C6 flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA) and CFlow Sampler software. Specific cell death was determined with the following formula: Specific cell death = % experimental cell death – % spontaneous cell death.

For inhibition experiments, eosinophils and/or Colo-205 cells were preincubated with human recombinant IL-18 binding protein-a (IL-18BPa) or with neutralizing mAbs, anti-IL-18 (clone 125-2H) (MBL, Nagoya, Japan), anti-ICAM-1 (clone BBIG-I1), and anti-junctional adhesion molecule A (anti-JAM-A; clone 654806) (R&D Systems, Minneapolis, MN). The isotype control was mouse IgG1 (clone 11711) (R&D systems).

#### *Quantitative real-time PCR*

IL-18 mRNA expression was evaluated in eosinophils, Colo-205 cells and co-cultured cells. For co-culture experiments, Colo-205 cells were plated and grown overnight in 6-well tissue culture plates. The medium was then replaced with complete medium, and  $1.5 \times 10^6$ /ml human eosinophils were added. After 3 h at 37 °C, eosinophils were collected by rinsing the plates with PBS. Then, Colo-205 cells were harvested with 0.05% trypsin EDTA. The purity of each fraction was then determined by detecting FITC-conjugated CD11a mAbs in flow cytometry. Purities were estimated to be > 95% (eosinophils) and >85% (Colo-205 cells).

Total RNA was isolated from eosinophils and Colo-205 cells with Trizol reagent (Invitrogen/Life technologies), according to the manufacturer' instructions. RNA (1 µg) was

reverse-transcribed to cDNA with a high capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems / Life technologies). Real-time PCR was performed on an ABI StepOnePlus (Applied Biosystems) with the fast SYBR<sup>®</sup> Green PCR master mix (Applied Biosystems). The sequences of the primers (Sigma-Aldrich) were as follows: IL-18, 5'-CCAAGGAAATCGGCCTCTAT-3' and 5'-TTGTTCTCACAGGAGAGAGTTGA-3';  $\beta$ -actin, 5'-GGGTCAGAAGGATTCCTATG-3' and 5'-GGTCTCAAACATGATCTGGG-3'. Threshold cycle (Ct) values of the target genes were normalized to those of  $\beta$ -actin. For the co-culture experiments, the relative change in gene expression was analyzed with the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method.

#### *Flow Cytometry*

For indirect intracellular staining, purified eosinophils or Colo-205 cells were fixed with 2% paraformaldehyde (Thermo Scientific, Rockford, IL), and then permeabilized in intracellular buffer (PBS with 1% BSA and 0.01% Saponin). Non-specific binding was blocked with mouse serum. The cells were first incubated with the mouse monoclonal IgM anti-IL-18 Ab (clone 12E7.1; Millipore, Temecula, CA) or mouse IgM isotype control (clone CG323, Millipore). After washing and blocking with goat serum, cells were incubated with a goat FITC-conjugated anti-mouse IgM Ab.

For cell surface staining, experiments were performed on ice in PBS with 1% BSA. After blocking with mouse serum, cells were incubated with mouse mAbs: FITC-conjugated anti-ICAM-1 (clone BBIG-I1), Alexa Fluor<sup>®</sup>488-conjugated anti-JAM-A (clone 654806; R&D Systems), FITC-conjugated anti-CD18 (clone L130), FITC-conjugated anti-CD11a (clone HI111; BD Bioscience), PE-conjugated anti ICAM-2 (clone CBR-IC2/2), PE-conjugated anti-ICAM-3 (clone CBR-IC3/1; Biolegend, San Diego, CA) or PE-conjugated anti-IL-18R $\alpha$  (clone H44; eBioscience, San Diego, CA), and matched isotype controls. Analysis was

performed on a BD Accuri<sup>TM</sup> C6 flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA) with CFlow Sampler software. The median fluorescence intensity (MFI) was calculated as follows:  
$$\%MFI = [(median\ Ab\ signal - median\ isotype\ control\ signal) / median\ isotype\ control\ signal] \times 100.$$

#### *Cell adhesion assay*

Adhesion between Colo-205 cells and eosinophils were assessed with flow cytometry, as previously described (9). Briefly, eosinophils were labeled with CFSE (Invitrogen, Carlsbad, CA) and Colo-205 cells were stained with the fluorescent cell membrane dye, PKH26. After 1.5 h co-incubations at 37 °C (5:1 ratio), the percentage of Colo-205 cells that bound to eosinophils was calculated as follows:  $\%Colo-205\ cell\ binding = \text{number of Colo-205 bound to eosinophils (PKH26}^+CFSE^+ \text{ cells)} / \text{total number of Colo-205 (PKH26}^+ \text{ cells)} \times 100$ . Conversely, the percentage of eosinophils bound to Colo-205 cells was calculated as:  $\%eosinophil\ binding = PKH26^+CFSE^+ \text{ cells} / CFSE^+ \text{ cells} \times 100$ .

#### *Statistical analysis*

All results are expressed as the mean  $\pm$  SEM. Statistical analyses were performed with SPSS software (SPSS, Chicago, IL). Non-parametric Wilcoxon or Mann-Whitney tests were used for comparisons between groups. Differences were considered significant when the p value was less than 0.05. We used the following symbols: \* p < 0.05; \*\* p < 0.01; \*\*\* p < 0.001; ns: no significant in the figures.

## **Results**

*Human eosinophil-induced death in some tumor cell lines is concentration- and time-dependent*

Previously, we demonstrated that human eosinophils, like T cells, exhibited cytotoxic potential against tumor cells, which involved gamma-delta TCR and cell-cell contact (8, 9). Here, we investigated the mechanisms of interaction between eosinophils and tumor cells. Previous epidemiological studies reported distinct relationships between eosinophilia and different types of tumors (3). Accordingly, we used flow cytometry to compare the tumoricidal effects of human eosinophils on different human tumor cell lines, including L428 (Hodgkin lymphoma), T24 (bladder carcinoma), HBL (melanoma), and Colo-205 (colon carcinoma). Significant tumor cell apoptosis was observed when eosinophils were added to T24, HBL, and Colo-205 cell lines, but not when added to L428 cells (Fig 1A). This result suggested that the tumoricidal function mediated by human eosinophils was target specific. In accordance with previous epidemiological studies, which showed that TATE was associated with a good prognosis in colorectal cancer, we found that eosinophils mediated high levels of specific cell death in Colo-205 cells (Fig 1B). Therefore, we selected Colo-205 cells for further investigations.

To discriminate between apoptosis and necrosis, we performed flow cytometry. The levels of Colo-205 apoptosis and necrosis in the presence of eosinophils were compared to the spontaneous levels of Colo-205 cell death (Fig 1C). Eosinophils induced significant levels of apoptosis and necrosis in Colo-205 cells after 3 h of co-incubation (Fig 1D). This effect was observed at all E:T ratios and at all time points tested (data not shown). Indeed, an E:T ratio of 2:1 induced  $27.1 \pm 2.7\%$  specific lysis in Colo-205 cells, and a 25:1 E:T ratio induced  $54.9 \pm 3.8\%$  specific lysis (Fig 1E.). Eosinophil-dependent cytotoxicity was observed within 15

min after co-culturing, and it significantly increased to  $62.1 \pm 4.9\%$  after 6 h (Fig 1F). Taken together, these findings revealed that human eosinophils could induce concentration- and time-dependent cell death in several cell lines, but notably in the Colo-205 carcinoma cell line.

#### *ICAM-1 and JAM-A are required for binding between Colo-205 to eosinophils*

Our previous studies indicated that contact between Colo-205 and eosinophils was required for cytotoxicity (9). Although the adhesion molecules, CD11a/CD18, have been implicated in eosinophil binding to Colo-205 (9), the nature of the ligands expressed on Colo-205 cells remained to be determined. Flow cytometry analysis revealed that Colo-205 expressed ICAM-1 and JAM-A, but not ICAM-2 or ICAM-3 (Fig 2A, 2B).

To confirm that these cell adhesion molecules participated in the binding of Colo-205 to eosinophils, we added neutralizing antibodies to the co-cultures. A significant reduction in Colo-205 binding to eosinophils was observed when tumor cells were preincubated with anti-ICAM-1 and anti-JAM-A neutralizing Abs (Fig 2C). However, only the anti-ICAM-1 neutralizing Abs induced a reduction in Colo-205 cell death (Fig 2D). Addition of both neutralizing antibodies did not reveal any synergism (data not shown). This suggested that, although both ligands were expressed, the role of ICAM-1 appeared to predominate.

#### *The IL-18 cytokine is involved in eosinophil-mediated cytotoxicity*

The protective role of IL-18 has been previously described in murine models of colon cancer (30). Tumors were observed significantly more frequently in colons of *il-18*<sup>-/-</sup> mice than in colons of WT mice (25, 26). Also, IL-18 gene transfer enhanced immune rejection of tumors in mice (19, 28). Upon finding that human eosinophils induced cell death in Colo-205 cells, we investigated the implication of IL-18 in our *in vitro* model. First, we examined whether IL-18 was expressed in human eosinophils or Colo-205 cells with quantitative PCR and flow

cytometry (Fig 3A, 3B). Although both cell types expressed IL-18 mRNA (Fig 3A), only eosinophils were positive for intracellular IL-18 staining in the flow cytometry assay (Fig 3B).

Given the expression of IL -18 by eosinophils, we next examined whether IL-18 expression changed after co-incubation with Colo-205 cells. We found that IL-18 mRNA expression in eosinophils increased by 4.3-fold when they were cultured with Colo-205 cells (Fig 3C), but no change in IL-18 expression was observed in the Colo-205 cells (Fig 3D). To investigate whether IL-18 was involved in the tumoricidal effect of eosinophils, we evaluated the inhibitory effects of an IL-18 neutralizing Ab and an IL-18 binding protein, a natural inhibitor of IL-18. Both inhibitors caused dose-dependent reductions in eosinophil-mediated Colo-205 cell death (Fig 3E, 3F), which indicated that IL-18 was involved in eosinophil-mediated Colo-205 cell death.

#### *Inhibition of IL-18 decreased binding between eosinophils and Colo-205 cells*

Previous studies have demonstrated that IL-18 played a role in mediating cell adhesion (32). Therefore, we investigated whether IL-18 was involved in cell-cell adhesion between eosinophils and Colo-205 cells. Inhibition of IL-18 with the IL-18 binding protein induced a significant reduction in the binding of Colo-205 to eosinophils after 1.5 h of co-incubation at an E:T ratio of 5:1; Colo-205 binding was reduced by 45% in the presence of 10 µg/ml IL-18 binding protein (Fig 4A). Similar results were obtained when the percentage of binding of eosinophils to Colo-205 was calculated. Addition of IL-18 binding protein decreased the binding of eosinophils to Colo205 by 69.5% (Fig 4B). Taken together, our results revealed that IL-18 contributed to the interactions between human eosinophils and Colo-205 tumor cells *in vitro*.

IL-18 is a pro-inflammatory cytokine that acts on immune and epithelial cells through the IL-18R complex. This heterodimeric receptor is composed of a ligand binding chain, known as IL-18R $\alpha$ , and an accessory chain, known as IL-18R $\beta$ . To determine whether eosinophils and tumor cells can communicate through IL-18 and IL-18R, we used flow cytometry to analyze the membrane expression of IL-18R $\alpha$ . We found that both human eosinophils and Colo-205 cells expressed this receptor (Fig 4C). The direct effect of IL-18 on Colo-205 death was investigated by incubating Colo-205 cells with recombinant human IL-18, in the absence of eosinophils. No death of Colo-205 cells was detected in the presence of IL-18 without effector cells (data not shown), suggesting an indirect effect of IL-18 in eosinophil-mediated cytotoxicity.

#### *IL-18 up-regulated CD11a and ICAM-1*

Given the involvement of IL-18 in human eosinophil-Colo-205 cell binding and the expression of IL-18R by both cell types, we next analyzed the effects of IL-18 on the expression of adhesion molecules involved in cell-cell contact. Specifically, we investigated the expression of CD11a, CD18, ICAM-1, and JAM-A. In Colo-205 cells, incubation with recombinant IL-18 for 1.5 h led to an increase in ICAM-1 membrane expression (Fig 5A), but no change was detected in JAM-A expression (Fig 5B). In eosinophils, IL-18 induced a strong up-regulation of CD11a, which increased by more than 50% (Fig 5C); to a lesser extent, IL-18 also induced an increase in CD18 membrane expression (Fig 5D). Taken together, these findings revealed that IL-18 appeared to act on human eosinophils and Colo-205 cells by up-regulating the membrane expression of adhesion molecules, both on the effectors and on the targets.

## **Discussion**

Anti-tumor immunity, and particularly immune surveillance, implies both innate and adaptive immune responses from tissue peritumoral microenvironment, which involves different cell types. Although the essential roles of lymphocytes, NK cells, and dendritic cells have been largely documented (33), new cell types that express tumoricidal activity have emerged, including eosinophils (3). In a previous study, we showed that human eosinophils could induce Colo-205 cell death, through a process that required LFA-1-mediated cell-cell contact (8, 9). In the present study, we found that IL-18 was involved in eosinophil-mediated cytotoxicity. We showed that IL-18 could up-regulate binding between eosinophils and Colo-205 cells.

Limited studies in mouse models have suggested that eosinophils were involved in anti-tumor immunity (3). However, due to the strong disparity between human and mouse eosinophils (8, 34), those results were not totally relevant to clinical situations. Several studies have attempted to assess the prognostic value of TATE to support, even indirectly, the tumoricidal properties of eosinophils and the benefit they might provide to patients. However, depending on the tumor type and stage of progression, studies have shown that increased numbers of eosinophils could be associated with either a good or a poor prognosis. Similarly, our data indicated that the antitumor activity of human eosinophils depended upon the target cells. Our results were consistent with previous epidemiological studies that showed TATE was associated with a good prognosis in colon cancer (4–7), because we showed that human eosinophils induced death in Colo-205 cells. In contrast, TATE was associated with a poor prognosis in Hodgkin's lymphoma (35, 36). This observation was consistent with our finding that eosinophils did not appear to be cytotoxic against L428 cells, a Hodgkin's lymphoma cell line. Thus, taken together, our results pointed to the specificity of eosinophil-mediated cytotoxicity, which may be relevant to clinical observations.



290 Like T cells and NK cells, eosinophil binding to tumor cells is required for cytotoxicity. This  
291 binding provides stable contact with target cells (9, 37). We previously showed that the  $\beta_2$   
292 integrin, LFA-1, played a crucial role in the cytolytic effect of eosinophils on Colo-205 cells  
293 (9). The interaction between LFA-1 and its ligands, ICAMs 1-3 and JAM-A, were shown to  
294 enhance leukocyte cell-cell binding (38, 39). In the basal state, Colo-205 cells express  
295 ICAM-1 and JAM-A. Our results indicated that both ligands contributed to cell-cell binding,  
296 but only ICAM-1 was involved in the cytolytic effect of eosinophils on Colo-205 cells.  
297 JAM-A is a transmembrane glycoprotein that belongs to the immunoglobulin superfamily.  
298 JAM-A is widely distributed in tissues, including the gastrointestinal tract (40). JAM-A can  
299 form heterodimers with LFA-1, but it also forms homodimers. The homophilic interactions  
300 are implicated in diverse cellular processes, such as cell-cell adhesion (41). Thus, JAM-A to  
301 JAM-A binding may also have been involved in our cell adhesion assay. ICAM-1 is both a  
302 cell surface glycoprotein that belongs to the immunoglobulin superfamily and a  
303 co-stimulatory molecule that provides signals to cytotoxic T lymphocytes and NK cells (42,  
304 43). Increasing evidence has suggested that ICAM-1 plays a functional role on the tumor cell  
305 surface. Consistent with our results, neutralization of ICAM-1 with an antibody or siRNA  
306 reduced both lymphocyte and NK cell adhesion to cancer cells, which then reduced their  
307 cytotoxicity against cancer cells (44, 45). Similarly, upregulation of ICAM-1 increased tumor  
308 susceptibility to lymphocyte adhesion and cell-mediated cytotoxicity (46, 47).  
309 The involvement of IL-18, a systemic, multifunctional cytokine (32), in anti-tumoral  
310 immunity remains controversial (18). This cytokine appears to have both pro- and anti-tumor  
311 activities. On one hand, IL-18 facilitated tumor cell immune escape by suppressing CD70,  
312 increasing metastatic potential, and promoting angiogenesis by stimulating production of  
313 CD44 and VEGF (48). On the other hand, IL-18 exerted antitumor effects by inducing an  
314 immune response to cancer cells, notably in colon cancer (19, 26–29). In addition to results

obtained in murine models, a phase II trial showed that IL-18 was well tolerated and induced antitumor effects when used alone in patients with advanced cancer (49). Although recent studies have focused on NK cells and cytotoxic T lymphocytes (30), the involvement of eosinophils was also envisaged, because eosinophils express IL-18R $\alpha$  and respond to this cytokine (17, 50). The present study showed that inhibiting IL-18 either with a neutralizing mAb or with the IL-18 binding protein led to a reduction in eosinophil-mediated cytotoxicity. The mechanism of inhibition was to decrease adhesion between eosinophils and Colo-205 cells. Because cell adhesion was required for IL-18-driven antitumor immunity (14), we investigated the effect of this cytokine on adhesion molecules expressed in both effectors and targets. Our data showed that IL-18 up-regulated ICAM-1 expression in Colo-205 cells and CD11a expression in human eosinophils. In tumor cells, ICAM-1 expression was inducible with cytokines. Thus, cytokines produced by infiltrating cells might influence the expression of ICAM-1 on tumor cells (51). This possibility was supported by the finding that the degree of mononuclear cell infiltration was significantly correlated with the expression of ICAM-1 by stromal cells in breast cancer and renal cancer and by malignant melanoma cells. Our results suggested that IL-18 up-regulated ICAM-1 and CD11a on immune and cancer cells, which could lead to an increase in target cell lysis by immune cells (47, 52, 53).

In conclusion, this study was the first, to our knowledge, to demonstrate that IL-18 played a major role in eosinophil cell-mediated lysis of colon carcinoma cells (Colo-205). Our results indicated that the mechanism of cell death required contact between tumor cells and human eosinophils. Therefore, the tumoricidal potential of eosinophils against various tumors, and notably in the evolution of colon cancer, should be further investigated in follow-up studies. Moreover, eosinophil activity should be linked to current immune therapeutics that involve IL-18.

340 **Acknowledgment:** We thank Sylvie Loiseau, Caroline Stremnitzer, and Arnaud Dendooven  
341 for technical assistance. We also thank Pr. G. Ghanem (L.O.C.E, Brussels, Belgium) for  
342 providing the HBL cell line. This work was in part supported by a National Programme  
343 Hospitalier de Recherche Clinique (PHRC) "SHE" 2008.

344 **Disclosures:** The authors have no financial conflicts of interest.

345

## References

1. Rothenberg, M. E., and S. P. Hogan. 2006. The Eosinophil. *Annu. Rev. Immunol.* 24: 147–174.
2. Costello, R., T. O’Callaghan, and G. Sébahoun. 2005. [Eosinophils and antitumour response]. *Rev. Médecine Interne* 26: 479–484.
3. Gatault, S., F. Legrand, M. Delbeke, S. Loiseau, and M. Capron. 2012. Involvement of eosinophils in the anti-tumor response. *Cancer Immunol. Immunother.* 61: 1527–1534.
4. Pretlow, T. P., E. F. Keith, A. K. Cryar, A. A. Bartolucci, A. M. Pitts, T. G. Pretlow, P. M. Kimball, and E. A. Boohaker. 1983. Eosinophil Infiltration of Human Colonic Carcinomas as a Prognostic Indicator. *Cancer Res.* 43: 2997–3000.
5. Fernández-Aceñero, M. J., M. Galindo-Gallego, J. Sanz, and A. Aljama. 2000. Prognostic influence of tumor-associated eosinophilic infiltrate in colorectal carcinoma. *Cancer* 88: 1544–1548.
6. Nielsen, H. J., U. Hansen, I. J. Christensen, C. M. Reimert, N. Brünner, and F. Moesgaard. 1999. Independent prognostic value of eosinophil and mast cell infiltration in colorectal cancer tissue. *J. Pathol.* 189: 487–495.
7. Harbaum, L., M. J. Pollheimer, P. Kornprat, R. A. Lindtner, C. Bokemeyer, and C. Langner. 2014. Peritumoral eosinophils predict recurrence in colorectal cancer. *Mod. Pathol. Off. J. U. S. Can. Acad. Pathol. Inc.*
8. Legrand, F., V. Driss, G. Woerly, S. Loiseau, E. Hermann, J.-J. Fournié, L. Hélot, V. Mattot, F. Soncin, M.-L. Gougeon, D. Dombrowicz, and M. Capron. 2009. A Functional  $\gamma\delta$ TCR/CD3 Complex Distinct from  $\gamma\delta$ T Cells Is Expressed by Human Eosinophils. *PLoS ONE* 4: e5926.
9. Legrand, F., V. Driss, M. Delbeke, S. Loiseau, E. Hermann, D. Dombrowicz, and M. Capron. 2010. Human Eosinophils Exert TNF- $\alpha$  and Granzyme A-Mediated Tumorcidal Activity toward Colon Carcinoma Cells. *J. Immunol.* 185: 7443–7451.
10. Munitz, A., I. Bachelet, S. Fraenkel, G. Katz, O. Mandelboim, H.-U. Simon, L. Moretta, M. Colonna, and F. Levi-Schaffer. 2005. 2B4 (CD244) Is Expressed and Functional on Human Eosinophils. *J. Immunol.* 174: 110–118.
11. Okamura, H., H. Tsutsui, T. Komatsu, M. Yutsudo, A. Hakura, T. Tanimoto, K. Torigoe, T. Okura, Y. Nukada, K. Hattori, K. Akita, M. Namba, F. Tanabe, K. Konishi, S. Fukuda, and M. Kurimoto. 1995. Cloning of a new cytokine that induces IFN- $\gamma$  production by T cells. *Nature* 378: 88–91.
12. Sawada, M., T. Kawayama, H. Imaoka, Y. Sakazaki, H. Oda, S. Takenaka, Y. Kaku, K. Azuma, M. Tajiri, N. Edakuni, M. Okamoto, S. Kato, and T. Hoshino. 2013. IL-18 Induces Airway Hyperresponsiveness and Pulmonary Inflammation via CD4<sup>+</sup> T Cell and IL-13. *PLoS ONE* 8: e54623.
13. Freeman, C. M., M. K. Han, F. J. Martinez, S. Murray, L. X. Liu, S. W. Chensue, T. J. Polak, J. Sonstein, J. C. Todt, T. M. Ames, D. A. Arenberg, C. A. Meldrum, C. Getty, L.

385 McCloskey, and J. L. Curtis. 2010. Cytotoxic Potential of Lung CD8<sup>+</sup> T Cells Increases with  
386 Chronic Obstructive Pulmonary Disease Severity and with In Vitro Stimulation by IL-18 or  
387 IL-15. *J. Immunol.* 184: 6504–6513.

388 14. Tanaka, F., W. Hashimoto, H. Okamura, P. D. Robbins, M. T. Lotze, and H. Tahara.  
389 2000. Rapid Generation of Potent and Tumor-specific Cytotoxic T Lymphocytes by  
390 Interleukin 18 Using Dendritic Cells and Natural Killer Cells. *Cancer Res.* 60: 4838–4844.

391 15. Sugie, T., K. Murata-Hirai, M. Iwasaki, C. T. Morita, W. Li, H. Okamura, N. Minato, M.  
392 Toi, and Y. Tanaka. 2013. Zoledronic acid-induced expansion of  $\gamma\delta$  T cells from early-stage  
393 breast cancer patients: effect of IL-18 on helper NK cells. *Cancer Immunol. Immunother.* 62:  
394 677–687.

395 16. Leung, B. P., S. Culshaw, J. A. Gracie, D. Hunter, C. A. Canetti, C. Campbell, F. Cunha,  
396 F. Y. Liew, and I. B. McInnes. 2001. A Role for IL-18 in Neutrophil Activation. *J. Immunol.*  
397 167: 2879–2886.

398 17. Chow, J. Y., C. K. Wong, P. F. Cheung, and C. W. Lam. 2009. Intracellular signaling  
399 mechanisms regulating the activation of human eosinophils by the novel Th2 cytokine IL-33:  
400 implications for allergic inflammation. *Cell. Mol. Immunol.* 7: 26–34.

401 18. Palma, G., A. Barbieri, S. Bimonte, M. Palla, S. Zappavigna, M. Caraglia, P. A. Ascierto,  
402 G. Ciliberto, and C. Arra. 2013. Interleukin 18: Friend or foe in cancer. *Biochim. Biophys.*  
403 *Acta BBA - Rev. Cancer* 1836: 296–303.

404 19. Nakamori, M., M. Iwahashi, M. Nakamura, K. Ueda, X. Zhang, and H. Yamaue. 2003.  
405 Intensification of Antitumor Effect by T Helper 1-dominant Adoptive Immunogene Therapy  
406 for Advanced Orthotopic Colon Cancer. *Clin. Cancer Res.* 9: 2357–2365.

407 20. Hashimoto, W., T. Osaki, H. Okamura, P. D. Robbins, M. Kurimoto, S. Nagata, M. T.  
408 Lotze, and H. Tahara. 1999. Differential Antitumor Effects of Administration of Recombinant  
409 IL-18 or Recombinant IL-12 Are Mediated Primarily by Fas-Fas Ligand- and Perforin-  
410 Induced Tumor Apoptosis, Respectively. *J. Immunol.* 163: 583–589.

411 21. Osaki, T., J.-M. Péron, Q. Cai, H. Okamura, P. D. Robbins, M. Kurimoto, M. T. Lotze,  
412 and H. Tahara. 1998. IFN- $\gamma$ -Inducing Factor/IL-18 Administration Mediates IFN- $\gamma$ - and IL-  
413 12-Independent Antitumor Effects. *J. Immunol.* 160: 1742–1749.

414 22. Tian, H., G. Shi, G. Yang, J. Zhang, Y. Li, T. Du, J. Wang, F. Xu, L. Cheng, X. Zhang, L.  
415 Dai, X. Chen, S. Zhang, Y. Yang, D. Yu, Y. Wei, and H. Deng. 2014. Cellular  
416 immunotherapy using irradiated lung cancer cell vaccine co-expressing GM-CSF and IL-18  
417 can induce significant antitumor effects. *BMC Cancer* 14: 48.

418 23. Zhang, B., K.-F. Wu, Y.-M. Lin, X.-T. Ma, Q. Rao, G.-G. Zheng, Z.-Y. Cao, G. Li, and  
419 Y.-H. Song. 2004. Gene transfer of pro-IL-18 and IL-1 $\beta$  converting enzyme cDNA induces  
420 potent antitumor effects in L1210 cells. *Leukemia* 18: 817–825.

421 24. Zaki, M. H., M. Lamkanfi, and T.-D. Kanneganti. 2011. The Nlrp3 inflammasome:  
422 contributions to intestinal homeostasis. *Trends Immunol.* 32: 171–179.

423 25. Salcedo, R., A. Worschech, M. Cardone, Y. Jones, Z. Gyulai, R.-M. Dai, E. Wang, W.  
424 Ma, D. Haines, C. O’Huigin, F. M. Marincola, and G. Trinchieri. 2010. MyD88-mediated

425 signaling prevents development of adenocarcinomas of the colon: role of interleukin 18. *J.*  
426 *Exp. Med.* 207: 1625–1636.

427 26. Zaki, M. H., P. Vogel, M. Body-Malapel, M. Lamkanfi, and T.-D. Kanneganti. 2010. IL-  
428 18 Production Downstream of the Nlrp3 Inflammasome Confers Protection against Colorectal  
429 Tumor Formation. *J. Immunol.* 185: 4912–4920.

430 27. Allen, I. C., E. M. TeKippe, R.-M. T. Woodford, J. M. Uronis, E. K. Holl, A. B. Rogers,  
431 H. H. Herfarth, C. Jobin, and J. P.-Y. Ting. 2010. The NLRP3 inflammasome functions as a  
432 negative regulator of tumorigenesis during colitis-associated cancer. *J. Exp. Med.* 207: 1045–  
433 1056.

434 28. Higashi, K., S. Hazama, A. Araki, K. Yoshimura, N. Iizuka, S. Yoshino, T. Noma, and M.  
435 Oka. 2014. A novel cancer vaccine strategy with combined IL-18 and HSV-TK gene therapy  
436 driven by the hTERT promoter in a murine colorectal cancer model. *Int. J. Oncol.* 45: 1412–  
437 20.

438 29. Hoffmann, D., W. Bayer, T. Grunwald, and O. Wildner. 2007. Intratumoral expression of  
439 respiratory syncytial virus fusion protein in combination with cytokines encoded by  
440 adenoviral vectors as in situ tumor vaccine for colorectal cancer. *Mol. Cancer Ther.* 6: 1942–  
441 1950.

442 30. Pages, F., A. Berger, S. Lebel-Binay, F. Zinzindohoue, C. Danel, B. Piqueras, O. Carriere,  
443 N. Thiounn, P. H. Cugnenc, and W. H. Fridman. 2000. Proinflammatory and antitumor  
444 properties of interleukin-18 in the gastrointestinal tract. *Immunol. Lett.* 75: 9–14.

445 31. Woerly, G., N. Roger, S. Loiseau, D. Dombrowicz, A. Capron, and M. Capron. 1999.  
446 Expression of Cd28 and Cd86 by Human Eosinophils and Role in the Secretion of Type 1  
447 Cytokines (Interleukin 2 and Interferon  $\gamma$ ) Inhibition by Immunoglobulin a Complexes. *J.*  
448 *Exp. Med.* 190: 487–496.

449 32. Dinarello, C. A., D. Novick, S. Kim, and G. Kaplanski. 2013. Interleukin-18 and IL-18  
450 binding protein. *Front. Inflamm.* 4: 289.

451 33. Pernot, S. 2014. Colorectal cancer and immunity: What we know and perspectives. *World*  
452 *J. Gastroenterol.* 20: 3738.

453 34. Decot, V., G. Woerly, M. Loyens, S. Loiseau, B. Quatannens, M. Capron, and D.  
454 Dombrowicz. 2005. Heterogeneity of Expression of IgA Receptors by Human, Mouse, and  
455 Rat Eosinophils. *J. Immunol.* 174: 628–635.

456 35. Wasielewski, R. von, S. Seth, J. Franklin, R. Fischer, K. Hübner, M. L. Hansmann, V.  
457 Diehl, and A. Georgii. 2000. Tissue eosinophilia correlates strongly with poor prognosis in  
458 nodular sclerosing Hodgkin's disease, allowing for known prognostic factors. *Blood* 95:  
459 1207–1213.

460 36. Glimelius, I., J. Rubin, K. Rostgaard, R.-M. Amini, M. Simonsson, K. M. Sorensen, K. E.  
461 Smedby, P. Venge, H. Hjalgrim, D. Molin, and G. Enblad. 2011. Predictors of histology,  
462 tissue eosinophilia and mast cell infiltration in Hodgkin's Lymphoma – a population-based  
463 study. *Eur. J. Haematol.* 87: 208–216.

37. Nutten, S., J.-P. Papin, G. Woerly, D. W. Dunne, J. MacGregor, F. Trottein, and M. Capron. 1999. Selectin and Lewisx are required as co-receptors in antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity of human eosinophils to *Schistosoma mansoni* schistosomula. *Eur. J. Immunol.* 29: 799–808.

38. Bleijs, D. A., R. de Waal-Malefyt, C. G. Figdor, and Y. van Kooyk. 1999. Co-stimulation of T cells results in distinct IL-10 and TNF- $\alpha$  cytokine profiles dependent on binding to ICAM-1, ICAM-2 or ICAM-3. *Eur. J. Immunol.* 29: 2248–2258.

39. Fraemohs, L., R. R. Koenen, G. Ostermann, B. Heinemann, and C. Weber. 2004. The Functional Interaction of the  $\beta$ 2 Integrin Lymphocyte Function-Associated Antigen-1 with Junctional Adhesion Molecule-A Is Mediated by the I Domain. *J. Immunol.* 173: 6259–6264.

40. Laukoetter, M. G., P. Nava, W. Y. Lee, E. A. Severson, C. T. Capaldo, B. A. Babbin, I. R. Williams, M. Koval, E. Peatman, J. A. Campbell, T. S. Dermody, A. Nusrat, and C. A. Parkos. 2007. JAM-A regulates permeability and inflammation in the intestine in vivo. *J. Exp. Med.* 204: 3067–3076.

41. Wojcikiewicz, E. P., R. R. Koenen, L. Fraemohs, J. Minkiewicz, H. Azad, C. Weber, and V. T. Moy. 2009. LFA-1 Binding Destabilizes the JAM-A Homophilic Interaction During Leukocyte Transmigration. *Biophys. J.* 96: 285–293.

42. Seventer, G. A. V., Y. Shimizu, K. J. Horgan, and S. Shaw. 1990. The LFA-1 ligand ICAM-1 provides an important costimulatory signal for T cell receptor-mediated activation of resting T cells. *J. Immunol.* 144: 4579–4586.

43. Anikeeva, N., M. Steblyanko, S. Fayngerts, N. Kopylova, D. J. Marshall, G. D. Powers, T. Sato, K. S. Campbell, and Y. Sykulev. 2014. Integrin receptors on tumor cells facilitate NK cell-mediated antibody-dependent cytotoxicity. *Eur. J. Immunol.* 44: 2331–2339.

44. Haustein, M., R. Ramer, M. Linnebacher, K. Manda, and B. Hinz. Cannabinoids increase lung cancer cell lysis by lymphokine-activated killer cells via upregulation of ICAM-1. *Biochem. Pharmacol.* .

45. Ren, Z., W. Kang, L. Wang, B. Sun, J. Ma, C. Zheng, J. Sun, Z. Tian, X. Yang, and W. Xiao. 2014. E2F1 renders prostate cancer cell resistant to ICAM-1 mediated antitumor immunity by NF- $\kappa$ B modulation. *Mol. Cancer* 13: 84.

46. Tachimori, A., N. Yamada, Y. Sakate, M. Yashiro, K. Maeda, M. Ohira, H. Nishino, and K. Hirakawa. 2005. Up regulation of ICAM-1 gene expression inhibits tumour growth and liver metastasis in colorectal carcinoma. *Eur. J. Cancer* 41: 1802–1810.

47. Wang, R., J. J. Jaw, N. C. Stutzman, Z. Zou, and P. D. Sun. 2012. Natural killer cell-produced IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  induce target cell cytolysis through up-regulation of ICAM-1. *J. Leukoc. Biol.* 91: 299–309.

48. Kang, J. S., S. Y. Bae, H. R. Kim, Y. S. Kim, D. J. Kim, B. J. Cho, H.-K. Yang, Y.-I. Hwang, K. J. Kim, H. S. Park, D. H. Hwang, D. J. Cho, and W. J. Lee. 2009. Interleukin-18 increases metastasis and immune escape of stomach cancer via the downregulation of CD70 and maintenance of CD44. *Carcinogenesis* 30: 1987–1996.

503 49. Robertson, M. J., J. W. Mier, T. Logan, M. Atkins, H. Koon, K. M. Koch, S. Kathman, L.  
504 N. Pandite, C. Oei, L. C. Kirby, R. C. Jewell, W. N. Bell, L. M. Thurmond, J. Weisenbach, S.  
505 Roberts, and M. M. Dar. 2006. Clinical and Biological Effects of Recombinant Human  
506 Interleukin-18 Administered by Intravenous Infusion to Patients with Advanced Cancer. *Clin.*  
507 *Cancer Res.* 12: 4265–4273.

508 50. Wang, W., T. Tanaka, H. Okamura, M. Sugita, S. Higa, T. Kishimoto, and M. Suemura.  
509 2001. Interleukin-18 enhances the production of interleukin-8 by eosinophils. *Eur. J.*  
510 *Immunol.* 31: 1010–1016.

511 51. Tomita, Y., H. Watanabe, H. Kobayashi, T. Nishiyama, S. Tsuji, K. Imai, T. Abo, M.  
512 Fujiwara, and S. Sato. 1993. Expression of intercellular adhesion molecule-1 on transitional  
513 cell cancer. Possible significance in immunity against tumor cells. *Am. J. Pathol.* 143: 191.

514 52. Stuyt, R. J. L., M. G. Netea, T. B. H. Geijtenbeek, B. J. Kullberg, C. A. Dinarello, and J.  
515 W. M. Van Der Meer. 2003. Selective regulation of intercellular adhesion molecule-1  
516 expression by interleukin-18 and interleukin-12 on human monocytes. *Immunology* 110: 329–  
517 334.

518 53. Kohka, H., T. Yoshino, H. Iwagaki, I. Sakuma, T. Tanimoto, Y. Matsuo, M. Kurimoto, K.  
519 Orita, T. Akagi, and N. Tanaka. 1998. Interleukin-18/interferon-gamma-inducing factor, a  
520 novel cytokine, up-regulates ICAM-1 (CD54) expression in KG-1 cells. *J. Leukoc. Biol.* 64:  
521 519–527.

522  
523



Figure 1: Purified human eosinophils exert tumoricidal activity. (A and B) Tumor cell lines, L428 (n=5), T24 (n=8), HBL (n=5), and Colo-205 (n=15), were labeled with PKH-26 and cultivated in the absence or presence of human eosinophils (Eos) at an E:T ratio of 25:1 for 3 h. Cytotoxicity was assessed by an annexin V staining. (A) White bars indicate spontaneous tumor cell death and black bars indicate tumor cell death after co-incubation with eosinophils. (B) Histogram compares specific cell death among the different cell lines. (C) Representative dot plots of 13 independent flow cytometry experiments. Colo-205 were stained with PKH26 to discriminate them from eosinophils. (*Left*) Colo-205 cell death was assessed by gating on M2. (*Right*) Apoptotic cells (annexin V) were discriminated from necrotic cells (propidium iodide) in the absence (complete medium alone: +CM) or presence of eosinophils (+Eos) (C and D) Apoptosis (Annexin V+ PI-) and necrosis (Annexin V+ PI+) were measured in Colo-205 cells double-stained with Annexin V-FITC and Propidium Iodide (PI) at 25:1 ratio after 3 h of co-culture. (E) Concentration dependence of cell death. Colo-205 cells stained with Annexin V and cultured for 3 h either alone (white bars) or with eosinophils (gray bars) at different E:T ratios. Dotted line represents the specific cytotoxicity (n=6-11). (F) Kinetics of eosinophil-induced Colo-205 cell death. Colo-205 (PKH26<sup>+</sup>) cells were incubated with eosinophils at a 25:1 E:T ratio for 0.25-6 h. The percent of annexin V positive cells (dashed line) indicates apoptotic cells. Spontaneous Colo-205 cell death (dotted line) and specific apoptosis (continuous line) are also indicated (n=7-21). Results are expressed as the mean  $\pm$  SEM. The Mann-Whitney test was performed for A-B and the Wilcoxon test was performed for D-E-F. \* p< 0.05; \*\* p < 0.01; \*\*\* p < 0.001

Figure 2: ICAM-1 and JAM-A expression and involvement in tumoricidal activity. (A) Representative histograms for 5 independent flow cytometry experiments show ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, and JAM-A expression on Colo-205 cell surfaces. Specific antibody detection is indicated in grey and detection of the matched Ab isotype controls is indicated in black (B) Box plot represents the percent change in median fluorescence intensity (% $\Delta$ MFI) for the indicated adhesion molecules expressed on Colo-205 cell surfaces (n=5). Dotted line represents significance threshold. (C) Effects of neutralizing mAbs, anti-ICAM-1, -2, -3 or anti-JAM-A (10  $\mu$ g/ml), on binding of Colo-205 to eosinophils after 1.5 h co-culture at 5:1 (E:T ratio; n=6). (D) Inhibition of eosinophil-mediated Colo-205 cell death by anti-ICAM-1 and anti-JAM-A mAbs (n=6) CM: complete medium; Isotype: control IgG Ab. Results are expressed as the mean  $\pm$  SEM. Wilcoxon test was performed for comparisons. \* p< 0.05; \*\* p < 0.01; \*\*\* p < 0.001

Figure 3: IL-18 expression in eosinophils and Colo-205 cells, and its involvement in eosinophil tumoricidal activity. (A) IL-18 mRNA expression was analyzed in human eosinophils (Eos, n=11) and Colo-205 cells (n=6) with quantitative real-time PCR. (B) Representative histograms of 6 (eosinophils) or 3 (Colo-205) independent flow cytometry experiments show intracellular expression of IL-18. The cells stained with the control Ab are indicated with the black line and the cells stained with anti-IL-18 mAb are indicated with the grey line. (C and D) Changes in mean mRNA expression of IL-18 (C) in eosinophils co-cultured without (Eos) or with Colo-205; or (D) in Colo-205 cells co-cultured without or with eosinophils (n=6). (E and F) Eosinophil-induced cell death was inhibited (E) with a neutralizing anti-IL-18 Ab (n=16) or (F) with IL-18 Binding Protein (IL-18BP), a natural inhibitor (n=5). Data were obtained after 1.5 h of co-culture at an E:T ratio of 25:1. CM: complete medium; Isotype: control IgG Ab. Results are expressed as the mean  $\pm$  SEM. A Wilcoxon test was performed for comparisons. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$

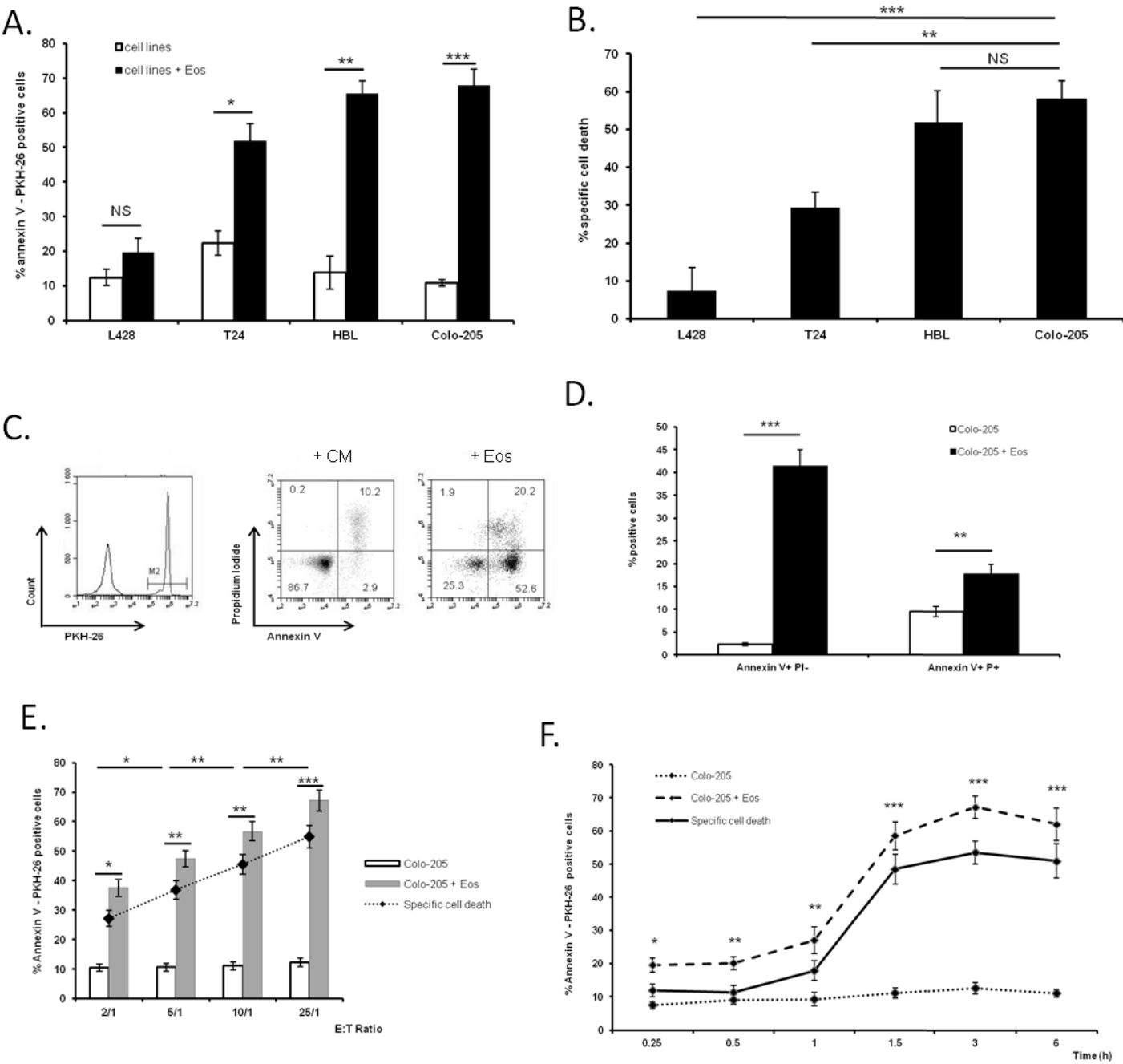
573 Figure 4: IL-18 mediates binding between eosinophils and Colo-205 cells. (A and B) Effect of  
574 IL-18 inhibition on binding between eosinophils and Colo-205 cells. PKH26<sup>+</sup> Colo-205 cells  
575 and CFSE<sup>+</sup> eosinophils were co-incubated at 37 °C for 1.5 h at an E:T ratio of 5:1 in presence  
576 of IL-18 binding protein (IL-18BP). The population containing both eosinophils and Colo-205  
577 was scored as double positive, and percentages were determined for (A) Colo-205 bound to  
578 eosinophils and (B) eosinophils bound to Colo-205 cells; n=5. Results correspond to the mean  
579  $\pm$  SEM. Wilcoxon test was performed for comparisons. \* p< 0.05; \*\* p < 0.01; \*\*\* p < 0.001.  
580 (C) Representative histograms of 5 (eosinophils, Eos) or 3 (Colo-205) independent flow  
581 cytometry experiments show IL-18R $\alpha$  expression. The cells stained with isotype control Ab  
582 are indicated in black and the cells stained with anti-IL-18R $\alpha$  mAb are indicated in grey. The  
583  $\Delta$ MFI are represented.

584

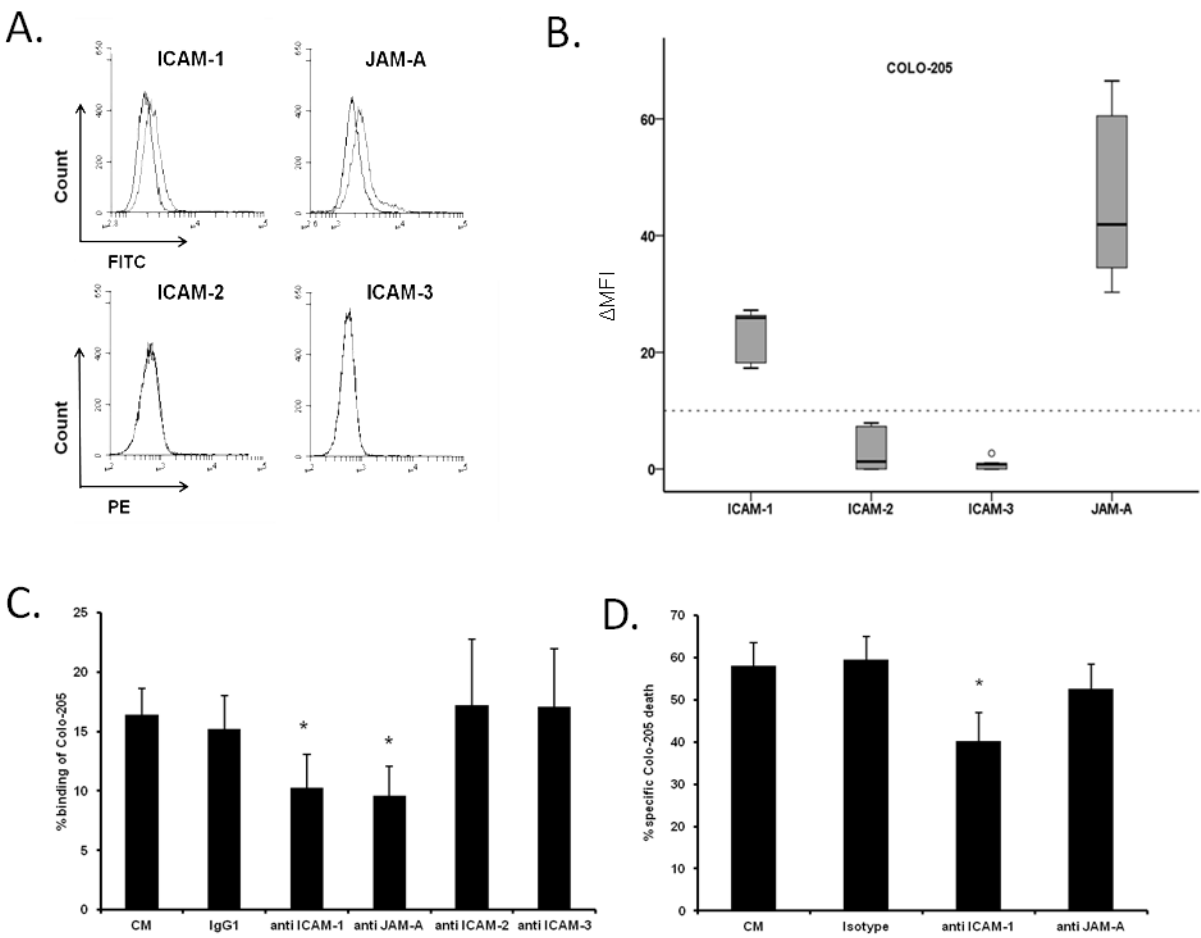
585 Figure 5: IL-18 up-regulates expression of ICAM-1 and CD11a. Purified eosinophils and  
586 Colo-205 cells were incubated for 1.5 h at 37 °C with recombinant IL-18. Flow cytometry  
587 data shows the Colo-205 cell surface expression of (A) ICAM-1 and (B) JAM-A and  
588 eosinophil (Eos) expression of (C) CD11a and (D) CD18. The percent change in median  
589 fluorescence intensity (% $\Delta$ MFI) is shown. Results are expressed as the mean  $\pm$  SEM (n=4).  
590 The Wilcoxon test was performed for comparisons. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$

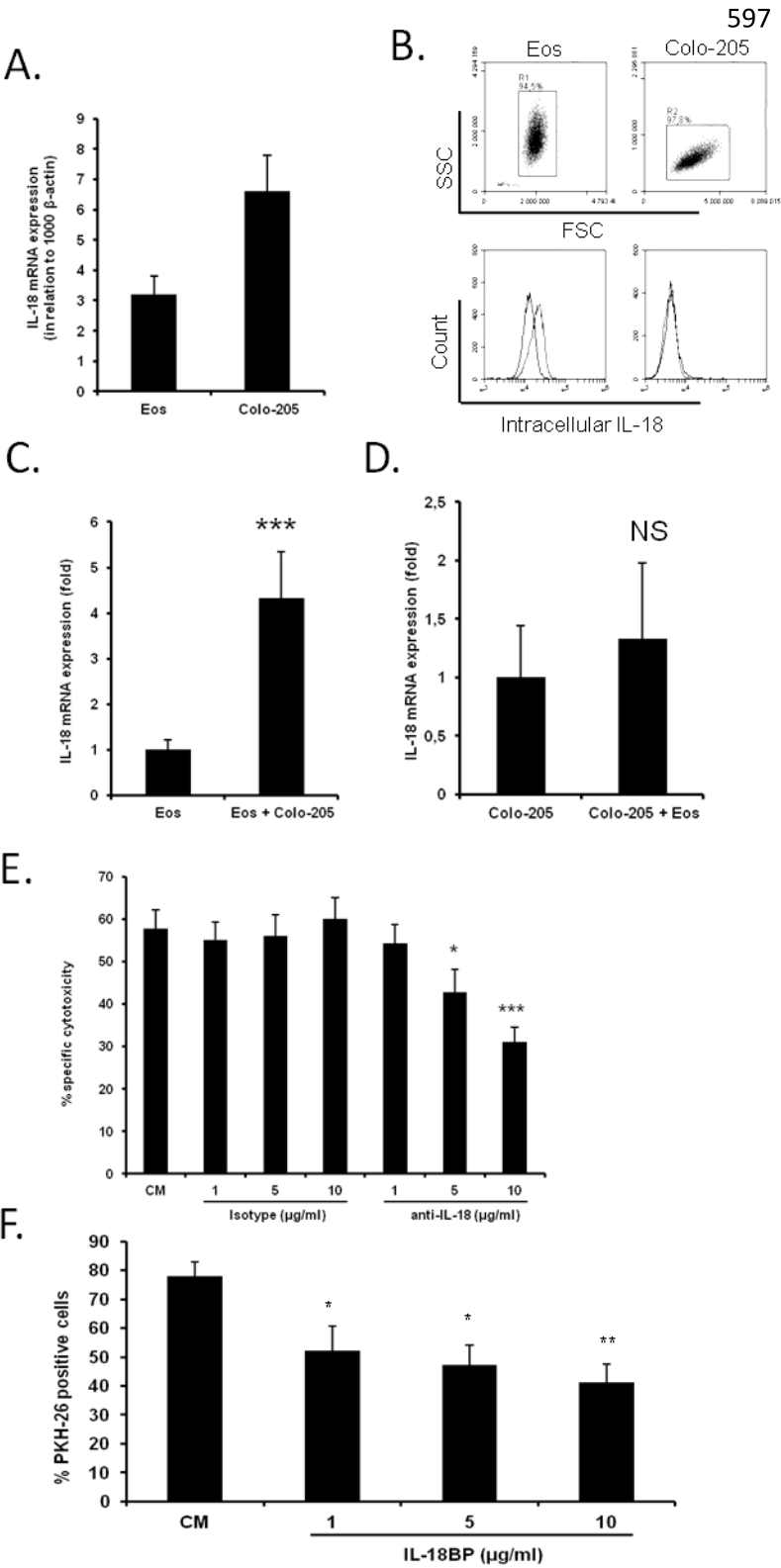
591

592 **Figure 1:**



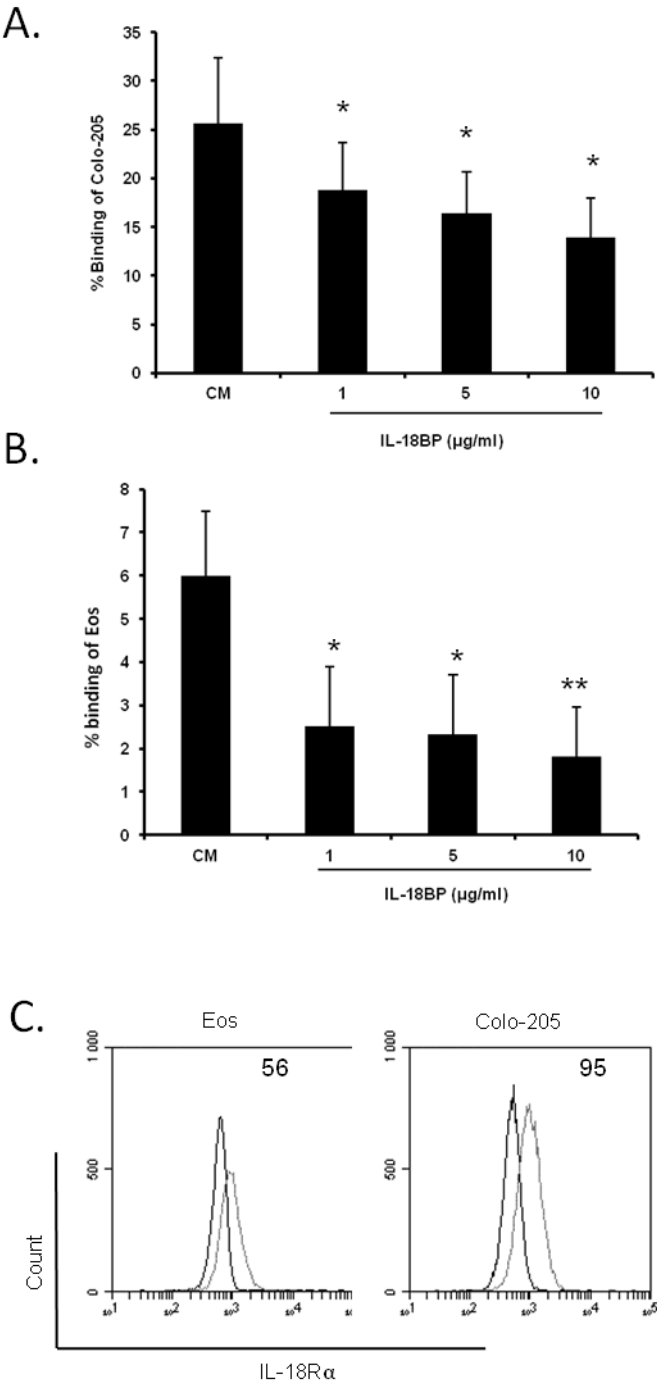
593





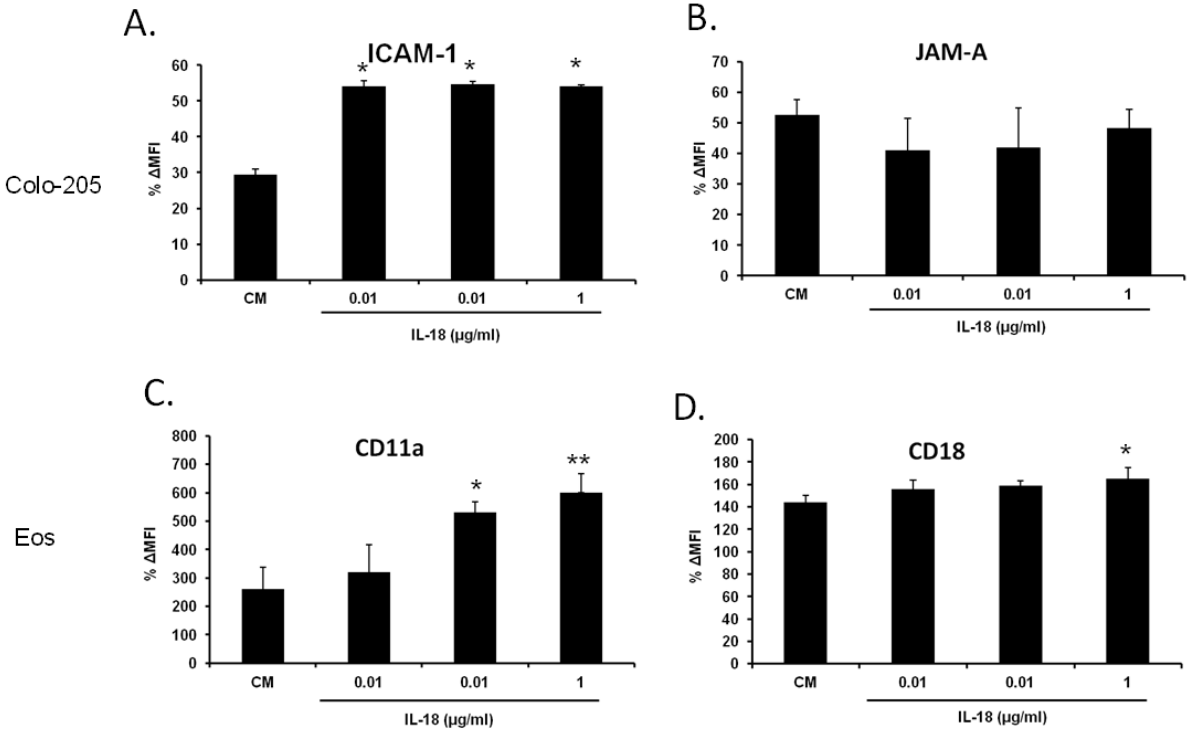


599 **Figure 4:**  
600



601

Figure 5:



**LE POLYNUCLEAIRE EOSINOPHILE**  
**NOUVEAUTES EN PHYSIOLOGIE ET IMPLICATIONS DIAGNOSTIQUES**

Lionel Prin

Institut d'Immunologie, « Réseau éosinophile », EA 2686

CHRU de Lille, Université Lille Nord de France

Pôle recherche, 1 Place de Verdun, 59045 Lille Cédex, France

Solène Gatault

Unité INSERM U995 (Team 3, Monique Capron)

Université Lille Nord de France

Pôle Recherche, 1 Place de Verdun, 59045 Lille Cédex, France

Guillaume Lefèvre

Institut d'Immunologie, « Réseau éosinophile », EA 2686

CHRU de Lille, Université Lille Nord de France

Pôle recherche, 1 Place de Verdun, 59045 Lille Cédex, France

Jean-Emmanuel Kahn

« Réseau éosinophile », EA 2686

Service de Médecine Interne

40 rue Worth, 92151 Suresnes Cedex, France

Lionel Prin, email : [lionel.prin@chru-lille.fr](mailto:lionel.prin@chru-lille.fr)

## **RESUME**

Le polynucléaire éosinophile (PNE) a été un leucocyte longtemps négligé. On lui reconnaît maintenant un large spectre de fonctions contrastées. Il peut être, à la fois, une cellule effectrice ou une cellule régulatrice impliquée lors des phases de progression ou de résolution de la réponse inflammatoire. Il peut donc exprimer des propriétés bénéfiques ou néfastes pour l'hôte. L'essentiel de ces données a été acquis grâce à l'étude de contextes pathologiques particuliers où dominent l'allergie et les parasitoses. Son impact dans d'autres affections et surtout sur certains processus homéostatiques suscite maintenant un intérêt croissant. Malgré le développement de méthodes d'analyses performantes, la définition précise du rôle physiopathologique du PNE est souvent délicate dans un contexte pathologique donné. Ces dernières années, la caractérisation de certains mécanismes de régulation de l'éosinophilie sanguine et tissulaire a été un des éléments novateurs les plus féconds. Il en est de même pour l'appréciation de son implication dans la réponse immunitaire innée et adaptative. Ces aspects, abordés dans le premier chapitre de cette revue (nouveau en physiologie), nous permettront de présenter dans la deuxième partie (implications diagnostiques), une classification « physiopathologique » des hyperéosinophilies (HEs) et d'insister particulièrement sur le fait qu'aucune HE ne doit être négligée. Ces différentes contributions présentent l'avantage d'assurer aujourd'hui une prise en charge diagnostique et thérapeutique plus adaptée des patients.

## **Mots-clés**

cellule sentinelle, régulatrice, effectrice ; réponse innée et adaptative ; hyperéosinophilies primitives et clonales ; secondaires et réactionnelles.

## **SUMMARY**

The eosinophil is a leukocyte that has long been neglected. It is now known to have a broad spectrum of contrasting functions. It can act as both an effector cell and a regulatory cell, involved in the progression or resolution phases of the inflammatory response. Its properties mean that it can be both beneficial and detrimental to the host. These findings have chiefly been acquired from the study of particular pathological contexts mainly associated with allergies and parasitic diseases. The impact of eosinophils on other disorders and in particular on certain homeostatic processes is now attracting increasing interest. Despite the development of high-performance analytical techniques, it can often be challenging to determine precisely the physiopathological role of eosinophils in a given pathological context. In recent years, the characterisation of certain regulatory mechanisms of blood and tissue hypereosinophilia (HEs) has been one of the most promising innovative findings. The same can be said of the growing awareness of its involvement in the innate and adaptive immune responses. Based on these aspects, which are dealt with in the first part of this review (*“Nouveautés en physiologie”*), we will present a “physiopathological” classification of HEs in the second part (*“Implications diagnostiques”*), and place particular emphasis on the fact that no HE should be ignored. Thanks to these various contributions, we are now in a position to offer patients more appropriate diagnosis and treatment.

## **Keywords**

sentinel, regulatory, effector leukocyte; secondary/reactive or primitive/clonal eosinophilia.

## **INTRODUCTION**

C'est l'affinité tinctoriale de ses granules secondaires pour les colorants acides, tels que l'éosine, qui a permis à Paul Ehrlich, en 1879, de singulariser cette cellule sanguine qui dérive d'un progéniteur commun de la lignée myéloïde (*figure 1*). Leucocyte longtemps négligé, le polynucléaire éosinophile (PNE) a connu un regain d'intérêt, en 1975, après la découverte de ses propriétés de cellule tueuse capable de détruire, au moins *in vitro*, des larves d'helminthes [1]. Cette potentialité cytotoxique a été d'autant plus mise en exergue qu'elle ouvrait des nouvelles perspectives sur l'origine des processus lésionnels tissulaires observés depuis longtemps dans le « syndrome hyperéosinophilique » ou SHE [2]. Le PNE exprime, en fait, un large spectre de fonctions très contrastées, effectrices ou régulatrices, protectrices ou délétères. L'essentiel de ces données a été acquis grâce à l'étude de « modèles pathologiques » associés fréquemment à une hyperéosinophilie (HE), notamment les allergies et les parasitoses. Aujourd'hui, c'est le rôle du PNE dans l'homéostasie qui suscite un intérêt croissant [3]. La mise en évidence de son implication dans la survie des plasmocytes médullaires en est une des illustrations les plus convaincantes [4,5].

Des méthodes d'analyses plus performantes permettent maintenant de mieux appréhender les multiples potentialités de ce polynucléaire. A titre d'exemples, on peut citer : la *cytométrie en flux* avec la possibilité d'immuno-marquages membranaires et cytoplasmiques (expressions : de la chaîne  $\alpha$  du récepteur de l'IL-5 ; de récepteurs de chimiokines comme CCR3, récepteur des éotaxines ; de lectines comme « sialic acid / binding immunoglobulin-like lectin 8 » ou SIGLEC-8 ; de protéines cationiques des granules secondaires) ; une technique efficace et rapide de *purification cellulaire* (séparation sur gradient de densité suivie d'une étape de sélection négative utilisant des billes immuno-magnétiques) , applicable chez les patients mais aussi chez les sujets sains avec un bon rendement (> 70%) et un haut degré de pureté en PNE (> 95%) ; une *analyse tissulaire* par immunohistochimie avec le recours d'anticorps monoclonaux dirigés notamment contre des protéines basiques granulaires [6,7] ; l'accès à différents *tests fonctionnels* permettant d'appréhender ses propriétés effectrices ou régulatrices (analyse de médiateurs sécrétés ou

libérés après activation membranaire utilisant les tests ELISA, la chimioluminescence.) [8–10], l'utilisation des techniques de *biologie moléculaire* surtout précieuses pour l'appréciation de certains dérèglements génétiques affectant précocement la lignée éosinophile (exemples de la RT-PCR ou de la technique de « Fluorescence *in situ* Hybridization » ou FISH ..), et enfin plus récemment, les apports prometteurs des outils de la *transcriptomique* mais aussi de la *protéomique* (2D-Differential In Gel Electrophoresis ou 2-D DIGE) [11]. Ces progrès, s'ils sont indéniables, n'offrent pas pour autant une explication toujours satisfaisante sur le rôle physiopathologique du PNE ou sur l'origine et les conséquences d'une HE sanguine ou tissulaire. Nous verrons, en effet, que la pertinence de certains résultats obtenus, *in vitro*, peut apparaître discutable, à la suite des observations faites, *in vivo*, soit dans les modèles expérimentaux ou en clinique. Il faudra également faire preuve de prudence avant d'exploiter, en pathologie humaine, des données acquises sur des modèles expérimentaux murins.

## **I. LE PNE : NOUVEAUTES EN PHYSIOLOGIE**

### **A. Régulation de l'éosinophilie sanguine et tissulaire**

Les principaux facteurs impliqués à la fois dans la production médullaire, le passage dans la circulation sanguine, la migration et la domiciliation tissulaire élective du PNE, sont mieux connus. Ces acquis donnent un nouvel éclairage sur les mécanismes inducteurs des HEs et permettent de proposer une classification plus appropriée (HEs primitives ou clonales, HEs secondaires ou réactionnelles).


#### **1. Production et développement**

Les PNE sont produits dans la moelle osseuse à partir de cellules souches hématopoïétiques multipotentes capables de s'auto-renouveler mais aussi de se différencier en progéniteurs communs (lymphoïde ou myéloïde, par exemple). A partir d'un progéniteur commun

myéloïde, certaines cellules vont s'engager vers la lignée éosinophile (*figure 2*). Des marqueurs phénotypiques d'apparition précoce ( $CD34^+$ ,  $CD38^+$ ,  $CD45RA^-$ ,  $IL-3\ R\ \alpha^+$ ,  $IL-5\ R\ \beta^+$ ) permettraient de les distinguer [12]. C'est au stade de promyélocyte et de myélocyte que cet engagement est bien visible grâce à l'apparition progressive de granules secondaires spécifiques riches en protéines cationiques (ou basiques) : la protéine basique majeure (Major Basic Protéine ou MBP, localisée dans le « core » central du granule), la peroxydase de l'éosinophile (Eosinophil Peroxidase ou EPO), la protéine cationique de l'éosinophile (Eosinophil Cationic Protein ou ECP à activité ribonucléase), la neurotoxine (Eosinophil-Derived-Neurotoxin ou EDN ayant les propriétés d'une « alarmine » ou DAMPs pour « Damage-Associated Molecular Patterns »). EPO, ECP et EDN sont localisées dans la matrice du granule. L'EPO (ou EPX) et l'isoforme 2 de la MBP (MBP-2) seraient les protéines granulaires les plus spécifiques du PNE. Près de 72 heures seraient nécessaires à la production médullaire des PNEs (1 à 6 % des cellules médullaires) puis à leur passage, sous forme de PNE mature, dans la circulation sanguine. Cette étape est sous le contrôle de chimiokines (éotaxines), de cytokines (IL-5) mais aussi de l'expression de molécules d'adhérence, notamment une  $\alpha L/\beta 2$ - intégrine (*lymphocyte function antigens* ; LFA.1).

Le détail des événements moléculaires requis pour orienter le programme d'un progéniteur vers la lignée éosinophile n'est pas encore précisément connu. Cet engagement serait néanmoins conditionné par la combinaison des effets de facteurs *extrinsèques* (notion de « niche médullaire » associée aux contacts facilités entre les cellules réticulaires du stroma et les cellules souches et à la proximité de facteurs de croissance, de cytokines et de chimiokines) et de facteurs *intrinsèques* (cinétique d'expression de facteurs de transcription). Les facteurs de croissance primordiaux pour la production médullaire des PNEs sont l'IL-3, le granulocyte macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) et surtout l'IL-5. Leurs récepteurs hétérodimériques (GM-CSF R, IL-3 R, IL-5 R) sont composés d'une chaîne  $\alpha$  spécifique et d'une chaîne  $\beta$  commune aux trois facteurs. Les principales kinases impliquées dans la transduction du signal consécutive à l'engagement des récepteurs sont des Janus kinases (JAK). Une fois activées, les JAK (JAK2 pour l'IL-3, le GM-CSF, l'IL-5) favorisent la dimérisation et la translocation nucléaire de facteurs de transcription



dénommés signal transducer and activators of transcription (STAT), notamment STAT.5 (IL-3, GM-CSF, IL-5) ou STAT.6 (IL-3). Pour l'engagement et le développement de la lignée éosinophile, des événements « intrinsèques » à la cellule seront tout aussi déterminants. Trois facteurs de transcription auraient un rôle critique : des membres de « GATA - binding protein family » (surtout GATA1 et GATA2) ; des membres de « CCAAT/enhancer-binding proteins » (C/EBP  $\alpha$  et C/EBP  $\epsilon$ ) et PU.1 (« ETS - protein family ») [13]. La cinétique variable d'expression de chacun de ces facteurs aboutit à différentes combinaisons possibles pour l'engagement vers telle ou telle lignée. Ainsi, une synergie d'effets entre GATA.1, PU.1 et des isoformes de C/EBP $\epsilon$  a été mise en évidence pour un engagement précoce, au stade promyélocyte vers la lignée éosinophile [14]. Des modèles d'études complémentaires tels que des protocoles de culture in vitro de cellules CD34<sup>+</sup> avec des facteurs de croissance spécifiques ou l'utilisation de différents modèles de souris transgéniques ont confirmé ces données. A titre d'illustration, la délétion du site de fixation de GATA.1 (sites situés dans des régions régulatrices de gènes, s'exprimant plus spécifiquement sur le PNE tels que les gènes codant la MBP, IL-5 R  $\alpha$  et CCR3) abolit le développement de la lignée éosinophile [15]. Un autre modèle de souris déficiente en PNE a été obtenu en réprimant l'expression du gène codant l'EPO (souris PHIL). Ce résultat confirme l'importance de la genèse des protéines cationiques granulaires comme facteur favorisant le développement de cette lignée [16]. Ces modèles sont très instructifs pour juger des propriétés que l'on prête au PNE dans différents contextes pathologiques. Ainsi, des souris invalidées pour le gène codant l'IL-5 gardent un taux basal de PNE sanguins (rôle de processus de suppléance ?) mais ne présentent pas d'HE induite par des helminthes ou par une stimulation allergénique [17]. Une connaissance toujours plus précise de ces événements moléculaires  impliquant notamment l'activation de kinases sera un atout précieux pour la compréhension des anomalies affectant précocement la lignée éosinophile dans le cadre des HEs primitives.

## 2. Migration et domiciliation tissulaire des PNE

Il existe une régulation du taux basal des PNE sanguins dont la valeur n'excède pas  $0.4 \times 10^9$  PNE/L. Après un bref transit sanguin de 12 à 18 heures, le PNE mature se localiserait

préférentiellement dans certains tissus comme le thymus, la rate, les ganglions (notamment la zone T-dépendante du cortex profond), la glande mammaire et l'utérus [18]. Les PNE résident aussi, en condition homéostatique, dans le tractus gastro-intestinal [19]. De récents travaux soulignent d'ailleurs l'influence de la flore commensale intestinale (microbiote) dans le contrôle de cette domiciliation [20]. L'expression membranaire constitutive mais aussi modulable de récepteurs de chimiokines (CCR3) et de cytokines (IL-5 R) ainsi que la présence de molécules de surface facilitant l'adhérence intercellulaire (sucres, sélectines, intégrines...) rendra le PNE apte à répondre d'abord à l'action de facteurs chimiotactiques puis à adhérer à l'endothélium de vaisseaux de différent sites tissulaires (*figures 3 et 4*). C'est cette séquence coordonnée qui déterminera une localisation élective (« homing » écotaxie) du PNE (*figure 5*). A titre d'exemple, l'expression d'une adressine de type MadCAM-1 (mucosal adressin cell adhesion molecule 1) sur les cellules endothéliales de la plaque de Peyer, est à l'origine du tropisme intestinal des PNE qui expriment les molécules complémentaires de type sélectine (CD62L) et intégrine ( $\alpha 4 \beta 7$ ).

Toute expression accrue de facteurs chimiotactiques et de molécules d'adhérence (exemple du VLA 4, particulièrement exprimé sur les PNE) amplifiera à la fois la mobilisation des éléments de la lignée éosinophile (état de pré-activation ou « priming » puis activation du PNE) et leur localisation élective dans tel ou tel tissu (asthme bronchique, dermatite atopique, rhinite, par exemple). Il s'agit d'HE réactionnelles liées à un mécanisme bien authentifié. L'IL-5, produite essentiellement par les lymphocytes activés de polarité TH2, est ici un acteur majeur. Elle exerce ses effets à la fois sur la production, la maturation, le recrutement, l'activation et la survie du PNE. Cette polarisation TH2 est elle même la résultante de l'intrication d'évènements complexes précoces et tardifs impliquant la réponse innée et/ou adaptative. Différents partenaires cellulaires seront concernés ainsi que différentes cytokines complémentaires récemment identifiées (thymic stromal lymphopoietin ou TSLP ; IL-25 ou IL-17E ; IL-33 ou « DAMPs » encore dénommée « alarmine » ) (*tableau 1*). A titre d'exemples, TSLP issue de cellules épithéliales [21], l'IL-33 produite par des cellules épithéliales, des cellules endothéliales, des fibroblastes ou des adipocytes [21,22] et l'IL-25 synthétisée par les TH2 eux-mêmes et par les mastocytes vont toutes

concourir au développement de cette polarisation TH2. L'IL-25 et l'IL-33 exerceront aussi leurs effets sur une nouvelle population de lymphocytes innés producteurs d'IL-5 (« innate lymphoid cells » ; ILC-2 ou nuocytes ou natural helpers) [23,24]. Au total, c'est l'action combinée de l'IL-5, mais aussi de l'IL-4, de l'IL-13 (autres « cytokines TH2 ») et des éotaxines (CCL11, CCL24, CCL26) qui va promouvoir la mobilisation et l'activation des PNEs. Plus en aval de la réponse immunitaire, d'autres effets amplificateurs seront dus à la production en excès de médiateurs libérés à la suite d'une réponse adaptative dérégulée : des chimiokines (CCL11, 24, 26 ; CCL5, CCL3 ...), des cytokines (IL-5, IL-4, IL-13), des médiateurs lipidiques (prostaglandines PGD2 , leucotriènes LTB4, platelet activating factor ou PAF-acether) ou encore des fractions activées du complément (anaphylatoxines ; C3a et C5a). Si, l'ensemble de ces données, régulièrement actualisées, témoigne d'une meilleure maîtrise des éléments de régulation d'une HE sanguine et tissulaire ; les conséquences de cette mobilisation du PNE sur l'environnement tissulaire font encore l'objet de nombreuses spéculations.

## **B. propriétés des PNE : un large spectre de fonctions**

Longtemps considérée comme une cellule active uniquement à la phase ultime de l'arc effecteur de la réponse immunitaire, le PNE apparaît aujourd'hui impliqué dans toutes ses étapes ; que celle-ci soit innée ou adaptative ; précoce ou tardive ; liée à sa phase de progression ou de résolution [25,26]. Le décodage et l'intégration de nombreux signaux membranaires reçus par le PNE vont peser sur l'orientation de son programme fonctionnel avec une capacité de production et de libération de très nombreux médiateurs (*figure 6*).

### **1. Le PNE : une cellule effectrice cytotoxique**

De nombreux médiateurs du PNE, néoformés (dérivés réactifs de l'oxygène, médiateurs lipidiques) ou préformés (protéines cationiques) ont la capacité d'altérer les fonctions de différentes cibles cellulaires. Des mécanismes variés de libération ou de sécrétion de médiateurs ont été identifiés : dégranulation associée à une cytolyse, exocytose de granules, libération

sélective de médiateurs selon un processus dénommé « piecemeal dégranulation » [27] et plus récemment, l'identification d'une libération en « catapulte » de DNA mitochondrial et de protéines cationiques (« Eosinophil Extracellular Traps ou EET) [28] (*figure 7*).

Après la découverte d'Anthony Butterworth, en 1975 [1] de nombreux travaux ont confirmé les potentialités cytotoxiques du PNE, notamment dans les helminthoses [29] et dans l'asthme [30]. Dans les parasitoses, cet effet est d'abord apparu comme un facteur de protection avec la lyse, au moins *in vitro*, des larves de parasites induites notamment par les protéines cationiques telles que la MBP et l'ECP. Néanmoins, l'efficacité réelle de ces mécanismes effecteurs, *in vivo*, fait maintenant l'objet de débats, surtout dans les modèles murins [31–33]. D'autres études récentes mettent même l'accent sur la capacité du PNE à faciliter la survie du parasite ! [34]. Chez l'homme parasité, l'afflux de PNE activés favoriserait plutôt la survenue d'effets collatéraux délétères [35]. Ce sont ces effets néfastes qui ont d'abord été invoqués dans l'asthme [30]. Ils permettaient aussi d'expliquer la survenue d'une fibrose endomyocardique observée dans différents contextes, parasitaires ou non, d'HEs massives persistantes. Cette propriété de cellule effectrice délétère ne résume pas pour autant toutes les potentialités du PNE, comme l'illustre l'exemple des parasitoses mais aussi celui de l'asthme. En effet, les traitements bloquant l'activité de l'IL-5 et limitant l'afflux de PNE, n'apportent pas les effets bénéfiques attendus sur des symptômes tels que l'hyperréactivité bronchique. Cette nouvelle approche thérapeutique ne paraît réellement efficace que dans des formes particulières d'asthmes ; celles associées notamment à une cortico-dépendance [36,37]. Ces résultats paradoxaux sur les fonctions effectrices mettent en lumière une probable dualité fonctionnelle du PNE capable d'exercer, à la fois des effets bénéfiques (lyse des parasites ou lyse tumorale [38] mais aussi des effets néfastes (processus lésionnels pro-inflammatoire, pro-fibrosant, pro-thrombotique.. ) chez l'hôte. Cette même dualité fonctionnelle de protection ou d'agression est retrouvée pour les fonctions régulatrices du PNE.

## **2. Le PNE : une cellule sentinelle et immunorégulatrice**

Une meilleure connaissance des récepteurs et médiateurs du PNE (*figure 6*), permet de mieux juger des nombreux échanges bidirectionnels qu'engage ce leucocyte avec son environnement cellulaire et tissulaire (*tableau 1*). En condition physiologique, il existe une localisation élective des PNE au niveau de certains organes. Cette observation souligne que l'impact du PNE sur certains processus homéostatiques ne doit plus être négligé. Producteur d'APRIL (« A Prolifération-Inducing Ligand ») et d'IL-6, il apparaît impliqué dans la survie plasmocytaire au sein de la « niche » médullaire [4]. Il jouerait également un rôle dans la réponse humorale primaire [39]. Des interactions PNE / Macrophages ont aussi été mises en évidence avec une promotion de la polarité M2 du macrophage du tissu adipeux participant à l'homéostasie métabolique [40]. Enfin, sa présence physiologique au sein de l'utérus et des glandes mammaires a été associée à différentes propriétés liées au remodelage et au développement tissulaire [41,42].

Une domiciliation propre à certains tissus sera conditionnée par les caractéristiques des réponses immunitaires et inflammatoires locales. Ainsi, l'induction entretenue par différentes cellules, d'une polarisation TH2 (*tableau 1*) jouera, nous l'avons vu, un rôle déterminant sur l'afflux tissulaire de ce leucocyte. Le PNE lui-même peut agir sur le recrutement d'autres cellules, notamment des lymphocytes T [43] et influencer sa polarisation [44]. Le PNE sera alors dans la proximité d'un grand nombre de partenaires cellulaires capables d'interagir directement ou indirectement avec lui (cellules épithéliales [21] cellules endothéliales, cellules dendritiques, cellules lymphoïdes de l'immunité innée ou adaptative, macrophages [45], mastocytes, fibroblastes, adipocytes...). Ces interactions cellulaires (*tableau 1*) auront essentiellement pour conséquence une amplification du recrutement et de l'activation du PNE. Elles seront à l'origine de différents profils possibles de réponses (alerte, agression, protection, régulation).

Le PNE exprime de nombreux récepteurs de l'immunité innée (« Pattern-Recognition Receptors » ou PRRs) membranaires ou intra-cytoplasmiques qui le rend capable d'induire un signal de danger. Celui-ci peut faire suite à des agressions *endogènes* (exemple des récepteurs d'alarmines comme l'IL-33 ou le High-Mobility-group.protein B1 : le « receptor for advanced

glycation end products » ou RAGE, le TLR2 et TLR4 ), et/ou à des agressions *exogènes* (exemples des Toll-Like Receptors ou TLRs 1-5,7 et 9 ; de Dectin -1 ; de NOD 1 et 2 ). Il est lui-même capable de produire des « alarmines » (exemple de l'EDN activant les cellules dendritiques [46]). Outre les PRRs, le PNE exprime également d'autres molécules de surfaces impliquées plus particulièrement dans la réponse immunitaire adaptative (expression de molécules ; membres de la superfamille des immunoglobulines aux effets activateurs ou inhibiteurs, mais aussi des molécules pro-apoptotiques de type lectine telles que SIGLEC-8 déjà citée) (*figure 6*).

L'ensemble de ces signaux précoces ou tardifs de l'immunité innée ou adaptative vont peser sur la polarité fonctionnelle du PNE qui ne se limite pas, nous l'avons vu, à sa seule fonction effectrice (survie, mort, activation, coopérations cellulaires). Ainsi, le PNE peut interagir avec les cellules dendritiques (EDN alarmine) et avoir lui-même des propriétés de cellule présentatrice d'antigènes. Il est capable, en effet, d'exprimer à la fois de molécules du CMH de classe II et de molécules de costimulation comme CD80/CD86 [47,48]. Il peut donc moduler la polarisation de la réponse adaptative (promotion de la polarité TH2 ; inhibition des polarités TH1 et TH17, par exemple). Par ailleurs le PNE, produit une large gamme de cytokines : pro inflammatoires (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8) ou régulatrices (TGF- $\beta$ , IL-10) ; de polarité TH<sub>1</sub> (IFN- $\gamma$ , IL-12), ou TH<sub>2</sub> (IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 et IL-25), [49] ainsi que des chimiotokines (eotaxines, CCL5 mais aussi CCL17 ET CCL22, facteurs chimiotactiques des TH2). Il synthétise également des facteurs impliqués dans les processus de remodelage et de réparation tissulaire (TGF- $\beta$ , fibroblast growth factor ou FGF ; Platelet derived growth factor ou PDGF, metalloprotéases, Vascular endothelium growth factor ou VEGF; Nerve growth factor ou NGF, neuropeptides, IL-6 et IL-1 $\beta$ ).

Au total, l'engagement du PNE dans un processus d'activation lié à de multiples interactions (*tableau 1*), pèsera sur le maintien ou non de l'intégrité de son environnement tissulaire. Si ce processus est bien contrôlé, cette activation peut avoir des vertus protectrices devant le développement : d'une lésion (épuration , clearance à la suite de l'activation de PNE par des DAMPs, par exemple), d'une infections [50], ou d'une tumeur [51] . En revanche, si l'activation est inappropriée et mal contrôlée, ses effets collatéraux peuvent servir de « starter » ou d'entretien

d'une réaction délétère. Elle peut, par exemple, favoriser la progression d'une réaction inflammatoire ou altérer les processus de réparation post-inflammatoire (angiogénèse, abrasion ou hyperplasie voire métaplasie épithéliale, hyperplasie de fibres musculaires lisses, thrombose, fibrose...).

Si toutes ces informations montrent qu'il est difficile d'intégrer l'ensemble des propriétés physiologiques et pathologiques d'un PNE dans une situation donnée, elles soulignent, en revanche, qu'aucune circonstance induisant une mobilisation de la lignée éosinophile ne doit être négligée. Ainsi, toute HE devra faire l'objet d'une enquête assidue pour en définir la cause et la traiter. Elle nécessitera aussi une surveillance régulière devant la menace de complications viscérales lors d'HE chroniques inexpliquées.

## **II. IMPLICATIONS DIAGNOSTIQUES : UNE CLASSIFICATION PHYSIOPATHOLOGIQUE DES HES**

L'HE est définie, nous l'avons vu, par l'existence d'un nombre absolu de PNE sanguins supérieur à  $0.4 \times 10^9/L$  ( $400/mm^3$ ) qui devra être confirmée par des hémogrammes répétés. Plusieurs situations d'HE peuvent être individualisées. Dans les cas les plus fréquents, l'HE apparaît clairement associée à une pathologie (HEs secondaires). Dans d'autres situations, les relations de causes à effets seront moins évidentes. C'est ici une dérégulation propre à la lignée éosinophile qui est souvent à l'origine de l'HE (HEs primitives). Dans chacun de ces contextes, l'HE peut s'inscrire ou non dans un cadre nosologique bien défini. Dans de rares circonstances, elle sera totalement isolée. Elle peut alors apparaître comme un signe révélateur précieux d'une pathologie sous-jacente. Dans des circonstances exceptionnelles enfin, il s'agira d'une HE « familiale » ou « héréditaire », ne s'accompagnant d'aucun signe pathologique.

### **A. HEs dans un contexte évocateur.**

Dans ces HEs secondaires, les causes ou les mécanismes à l'origine de la mobilisation de la lignée éosinophile sont parfois bien définis (HEs dites réactionnelles) ou font l'objet de débats (HEs dites d' « accompagnement ») (*tableau II*). A l'issue d'une enquête méthodique et rigoureuse, les données de l'anamnèse (circonstances de survenue de l'HE, niveau de l'HE sanguine, son ancienneté, sa courbe évolutive fluctuante ou persistante, les signes cliniques associés mêmes fugaces...) et de l'examen clinique permettront le plus souvent de guider la prescription d'examens complémentaires de première intention qui confirmeront le diagnostic. Le traitement de l'évènement causal de l'HE entraînera, dans la majorité des cas, sa disparition plus ou moins rapide. L'allergie et les helminthoses sont des exemples d'HEs réactionnelles. Ici, le rôle inducteur et/ou amplificateur de la polarité TH2 avec sa production accrue d'IL-5, est bien documenté. C'est dans le cadre de certaines de ces HEs réactionnelles, surtout dans l'asthme, qu'ont été testés des anticorps monoclonaux humanisés anti-IL-5 (mepolizumab, reslizumab), anti-chaîne  $\alpha$  du récepteur de l'IL-5 (benralizumab) ou anti-IL-13 (lebrikizumab). De même, c'est la production de facteurs de croissance et de cytokines par les clones tumoraux qui sera aussi à l'origine d'une HE « paracronale » au cours de certains cancers (tumeurs solides, leucémies, lymphomes). Enfin, dans le cas d'une HE faisant suite à un traitement, c'est la régression, souvent lente de celle-ci, après l'éviction d'un médicament qui seule permettra d'établir une relation de cause à effet. Les HEs dites « d'accompagnement », peuvent être associées au développement de maladies systémiques ou de pathologies spécifiques d'organes avec une éosinophilie sanguine et/ou tissulaire qui apparaît parfois au premier plan (*tableau II*). L'origine et les risques encourus dans ces « HEs dites « d'accompagnement » ne sont pas toujours clairement définis. Dans certaines de ces situations, des travaux récents ont permis de proposer un mécanisme causal (exemples de la TH2 dépendance de l'oesophagite à éosinophiles avec le rôle de CCL26 et de TSLP ou de l'implication de l' IL-25 dans la granulomatose éosinophilique avec polyangéite, anciennement dénommé « syndrome de Churg et Strauss » [52].)



## **B. HEs dans un contexte moins évocateur.**

Il existe des situations plus rares où nous ne disposons d'aucune orientation diagnostique évidente, même après de nombreuses investigations cliniques et paracliniques complémentaires. Ce contexte particulier est d'autant plus préoccupant que l'HE est souvent élevée ( $>1 \times 10^9/L$ ), persistante et peut avoir de graves conséquences évolutives (risque de développement d'un processus oncogène sous-jacent et/ou de lésions viscérales). Devant ces HE chroniques inexpliquées, le diagnostic de syndrome hyperéosinophilique (SHE) est alors souvent proposé, parfois de façon abusive. Ce SHE présenté initialement comme une entité pathologique, recouvre en fait des situations très hétérogènes. Il s'agissait alors exclusivement d'un diagnostic d'exclusion qui ne pouvait être retenu qu'après avoir réalisé une enquête étiologique rigoureuse. Une première définition du SHE, proposée en 1975 [2] associait les critères suivants : HE sanguine massive ( $>1.5 \times 10^9/L$ ), d'origine inconnue, qui évolue depuis au moins 6 mois et qui entraîne des lésions viscérales variées où domine la fibrose endomyocardique. Une actualisation de ces données a fait l'objet d'une récente publication [53]. A la suite de l'individualisation de ce SHE, la prise en charge de ces patients s'est vite avérée délicate devant la multiplicité des tableaux cliniques rencontrés. On s'interrogeait notamment sur la signification de certains signes hématologiques associés évoquant un syndrome myéloprolifératif (SMP), un syndrome myélodysplasique (SMD) ou un état pré-leucémique. Dans d'autres contextes, ce sont les lésions viscérales qui prédominaient. Certains auteurs évoquent, encore aujourd'hui, la possibilité de syndromes de « chevauchement » [54,55]. Il n'existe donc pas un SHE mais des SHEs. Certains seront la traduction d'un dérèglement central affectant la lignée éosinophile (HEs primitives, clonales associées à une hémopathie maligne) (*tableau III*) ; d'autres témoigneront d'un dérèglement affectant d'autres lignées (HEs secondaires ; exemple du variant « lymphoïde » du SHE).

## **C. HE “primitives” et SHE.**

Pour pallier aux difficultés de classification des SHEs, nous disposons aujourd'hui de nouveaux outils conceptuels et méthodologiques. Nous avons décrit précédemment l'impact de la combinaison de signaux extrinsèques et/ou intrinsèques au cours du processus « d'éosinophilopoïèse ». Des remaniements chromosomiques (translocation réciproque, délétions) affectant des gènes impliqués dans le développement et la croissance des éléments de la lignée éosinophile, vont altérer gravement son programme de différenciation. En fonction du stade de maturation de la cellule affectée (cellule souche, progéniteur myéloïde commun, progéniteur lymphoïde commun, progéniteur éosinophile..) et des conséquences locales de cette prolifération clonale, de nouvelles classifications ont été proposées. (*tableau IV*) [56]

## **1. HE clonales et Hémopathies malignes**

Une forme « maligne » ou myéloproliférative de SHE a d'abord été individualisée (HE avec splénomégalie, myélofibrose, vitamine B12 et tryptase sériques élevées ainsi que les taux de transcobalamine I et III...). Le pronostic était alors souvent lié au risque d'atteintes cardiaques (fibrose endomyocardique). Par ailleurs, on notait ici une constante cortico-résistance. La présence de ces atypies cliniques et biologiques rencontrées au cours de cette forme myéloproliférative de SHE nécessitera une enquête approfondie à la recherche d'une HE clonale ou d'une hémopathie maligne sous-jacente [57].

De nombreuses publications ont fait état, dans le passé d'anomalies chromosomiques dans le cadre d'HE isolées ou associées à des SMP ou SMD sans pouvoir établir de relation de cause à effet évidente avec l'HE. La plupart de ces anomalies sont rares, mais leur existence justifie la réalisation d'un médullogramme avec caryotype devant toute HE chronique inexpiquée. Le complément d'analyse utilisant les outils de la biologie moléculaire est souvent indispensable (FISH, RT-PCR nichée). L'ensemble de ces techniques a permis de mieux situer la place de la lignée éosinophile dans ces hémopathies malignes (*tableau III*). Ces remaniements

chromosomiques peuvent, par exemple, induire la formation de gènes de fusion mettant en jeu des protéines à activité tyrosine kinase impliquées dans la signalisation soit de récepteurs membranaires de facteurs de croissance, soit de molécules cytosoliques (ABL, JAK.2). Une activation constitutive de ces kinases entraînera une prolifération cellulaire incontrôlée. Ils concernent, par exemple, le récepteur de facteur de croissance des fibroblastes ou FGFR1 [58,59]. Dans le cas du récepteur pour le facteur de croissance des plaquettes ou PDGFR, les chaînes  $\alpha$  ou  $\beta$  peuvent être impliquées [60]. Dans d'autres cas, ces techniques ont permis de singulariser de nouvelles entités telles que la leucémie chronique à éosinophiles (*tableau III*).

## **2. Une nouvelle entité : La leucémie chronique à éosinophile**

Il s'agit d'une anomalie clonale qui est liée à une délétion interstitielle de 800kb du chromosome 4 (4q12) à l'origine de la création d'un gène de fusion FIP1L1-PDGFR $\alpha$  qui code un produit à activité tyrosine kinase constitutive [61]. Cette anomalie non détectable sur un caryotype médullaire peut affecter plusieurs lignées mais l'effet sur la lignée éosinophile apparaît déterminant avec l'induction d'une HE sanguine massive et persistante. Des résultats récents montrent que l'expression de ce transcrit active une cascade de signaux de transduction (Ras/MEK et p38 MAP kinase) qui agissent sur des facteurs de transcription (GATA, C/EBP) facilitant l'engagement des progéniteurs vers la lignée éosinophile. Au laboratoire, nous avons mis en évidence l'implication du métabolisme oxydatif de cette singularité [11]. Le recours aux différentes techniques de biologie moléculaire (FISH et RT-PCR) s'avère ici indispensable car les examens de cytogénétique conventionnelle ne permettent pas d'identifier le gène de fusion. Dans ce contexte qui représente moins de 20% des SHE, on note une remarquable efficacité du traitement par Imatinib [61]. Si la recherche d'un transcrit de fusion FIP1L1-PDGFR $\alpha$  est négative, et à fortiori, en cas de cortico-résistance et face à d'autres anomalies de l'hémogramme (augmentation de la vitamine B12 ou de la tryptase sériques), un médullogramme, un caryotype médullaire et le recours aux techniques de biologie moléculaire seront indispensables. D'autres remaniements chromosomiques qui peuvent

induire, nous l'avons vu, une activation constitutive d'autres kinases (FGFR1, PDGFR  $\alpha$  ou  $\beta$ ) seront alors à rechercher (*tableau III*)

#### **D. HE « réactionnelles » et SHE : le variant lymphoïde**

Cette forme d'HE réactionnelle résulte d'une altération de l'homéostasie lymphocytaire qui a pour conséquence une orientation privilégiée de la polarité TH2 et une production accrue d'IL-5. Les lymphocytes en cause ont un phénotype aberrant qui permet leur identification en cytométrie en flux. Le plus souvent, il s'agira de lymphocytes T CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> (présence de CD3 et de TCR  $\alpha/\beta$  en intra cytoplasmique.), plus rarement de lymphocytes T CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD7<sup>-</sup> et CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> TCR  $\alpha / \beta$  [62,63]. A ce jour, l'origine du dérèglement affectant la lignée lymphoïde n'est pas connue. La fréquence de ce variant lymphoïde au sein des SHE est variable selon les critères retenus, en moyenne, elle n'excède pas 20 %. Ainsi devant toute HE chronique inexplicée, une analyse en cytométrie en flux avec co-marquages membranaires et cytoplasmiques se justifie pour identifier cette population sanguine de lymphocytes T anormaux. Celle-ci peut être faiblement représentée dans les stades précoces. La recherche d'une clonalité T associée n'apparaît pas toujours contributive et ne doit pas faire porter par excès un diagnostic de SHE lymphoïde en l'absence d'anomalie phénotypique. La corticosensibilité est ici la règle mais la nécessité d'un recours à une épargne cortisonique est fréquente en raison d'une corticodépendance à des doses de corticoïdes souvent supérieures à 10 mg / j. On pourra alors utiliser l'interféron alpha, la ciclosporine. Un traitement par un anticorps monoclonal anti-IL5 peut s'avérer précieux , notamment pour réduire ces doses de corticoïdes [64,65].

## CONCLUSION

Un nouveau concept de « maladie à éosinophiles » est né. Le « Year 2011 Working Conference on Eosinophil Disorders and Syndromes » a été à l'origine de la définition de nouveaux critères permettant d'établir à la fois une classification et des recommandations de prise en charge des HEs. Malgré d'indéniables progrès, plus de 60% de cas d'HE chroniques restent encore aujourd'hui inexpliquées (HEs [66,67] de signification indéterminée). Dans ce cadre, nous ne disposons effectivement d'aucun contexte clinique évocateur (hémopathie sous-jacente, HE réactionnelle..) ni de marqueur permettant d'objectiver une anomalie moléculaire expliquant une éventuelle activation incontrôlée de kinases ou une dérégulation de l'homéostasie lymphocytaire T. Une surveillance régulière est ici impérative pour juger d'une éventuelle évolution clinico-biologique défavorable. Un nouveau contexte évocateur de SHE peut s'accompagner de marqueurs indicatifs (hémopathie maligne, variant myéloïde ou lymphoïde de SHE) ou non (syndrome hyperéosinophilique idiopathique). Parmi les approches méthodologiques novatrices disponibles, les outils de la biologie moléculaire (exemple du « Next-Generation Sequencing » ou NGS, avec l'étude d'un panel de mutations génétiques à la recherche d'un marqueur de clonalité), pourraient néanmoins ouvrir des perspectives fécondes. Devant la difficulté de certaines prises en charge, un réseau éosinophile (« French Eosinophil Network ») a été mis en place pour assurer une meilleure coordination de prescriptions et une validation des approches méthodologiques souvent complexes sur des groupes représentatifs de patients[68].

## LEGENDES DES FIGURES

### **Figure 1 : Singularités des aspects structuraux et ultra-structuraux du PNE**

En microscopie optique (A), le PNE sanguin, cellule mature au noyau bilobé, se distingue par ses granules spécifiques rouge-orangés après coloration au May Grünwald Giemsa (MGG). En microscopie électronique (B), ces granules secondaires spécifiques sont facilement repérables avec leur zone centrale sombre, dense aux électrons (« core » ou « cristalloïde » riche en MBP) entourée d'une matrice plus claire (riche en ECP, EDN et EPO). Ces granules contiennent aussi d'autres composants (enzymes, cytokines, chimiokines, facteurs de croissance). Les granules primaires contiennent une lysophospholipase ou galactine 10 qui sera à l'origine de la formation de cristaux de Charcot-Leyden lors de processus de cytolyse. Il existe enfin des corps lipidiques (riches en prostaglandines, leucotriènes, thromboxanes, PAF-acether) dont la présence en excès peut modifier la densité cellulaire. C'est cette propriété qui a permis les premières identifications et purifications de PNE « hypodenses » activés, après séparation des cellules par gradient de densité (métrizamide).

### **Figure 2 : Production et développement médullaire des PNE**

A partir d'un progéniteur myéloïde commun, différents facteurs, à la fois extrinsèques et intrinsèques à la cellule, vont favoriser son engagement spécifique vers la lignée éosinophile. Le contrôle de la genèse des protéines cationiques est un des facteurs clés pour cette différenciation en PNE.

### **Figure 3 : Les facteurs chimiotactiques du PNE**

Le PNE exprime un grand nombre de récepteurs de facteurs chimiotactiques : des récepteurs de chimiokines, notamment le CCR3 (récepteur des éotaxines : CCL11, CCL24, CCL26), des

récepteurs de cytokines (notamment l'IL-5) et des récepteurs de différents médiateurs de la réponse inflammatoire (prostaglandines, leucotriènes, PAF-acether, anaphylatoxines).

#### **Figure 4 : Les molécules d'adhérence du PNE**

Le PNE exprime à la fois des sucres (exemple du lactosamino-glycanes sialylés comme le sialyl Lewis X ou CD 15, ligand de la sélectine P ou PSGL-1), des adressines (CD34) et des sélectines (CD62L). Ces échanges moléculaires bi-directionnels entre glycoconjugués et sélectines ; exprimés, à la fois, sur le PNE et sur la cellule endothéliale ; seront impliqués dans les étapes précoces (« rolling ») et tardives (domiciliation, diapédèse) d'interactions entre le PNE et la cellule endothéliale . Le PNE exprime aussi des intégrines capables de se lier, à la fois à des molécules présentes sur l'endothélium vasculaire (étape d'adhérence et de migration trans-endothéliale : implication des membres de la superfamille des Immunoglobulines tels que ICAM et VCAM)) et à des composés de la matrice extra cellulaire (domiciliation tissulaire).

#### **Figure 5 : Régulation de la domiciliation des PNE**

Une localisation tissulaire élective sera facilitée par des échanges sélectines-adressines : après migration trans-endothéliale, le PNE se fixera dans la matrice extracellulaire du tissu ciblé (exemple des échanges intégrine-fibronectine, CD44-acide hyaluronique).

#### **Figure 6 : Principaux récepteurs et médiateurs du PNE**

L'identification des nombreux récepteurs de membrane du PNE montre que celui-ci peut recevoir de très nombreux messages de son environnement. A l'issue d'activations membranaires dépendantes de multiples interactions cellulaires, les différents signaux induits conditionneront le destin du PNE : sa survie (rôle notable de l'IL-5), son programme fonctionnel (récepteurs activateurs ou inhibiteurs) ou sa mort par apoptose (rôle de SIGLEC-8). La grande variété de

production de médiateurs préformés ou néoformés explique l'aptitude du PNE à participer, en fonction du contexte environnemental, à des processus effecteurs ou régulateurs ; délétères ou bénéfiques de la réponse immune innée ou adaptative.

**Figure 7 : Modalités de libération de médiateurs**

Le processus de libération de médiateurs peut être actif (exocytose de granules ou phénomène de sécrétion sélective par « piecemeal degranulation »), passif (nécrose de la cellule) ou dépendant de la formation d' « Eosinophil Extracellular Traps » ou EET. Ce dernier mécanisme, déjà décrit pour le polynucléaire neutrophile, serait à l'origine d'effets protecteurs bactéricides. Son efficacité *,in vivo*, doit encore être confirmée.



Tableau I : des exemples d'interactions cellulaires avec le PNE

Partenaires cellulaires	Principales conséquences fonctionnelles
<b>Cellules épithéliales / PNE</b>	Survie et activation des PNE
Cellules épithéliales (TSLP, IL-33)	<i>Polarisation TH2</i>
<b>Cellules endothéliales / PNE</b>	Migration et domiciliation des PNE
Cellules endothéliales (IL-33)	<i>Polarisation TH2</i>
<b>PNE (EDN) / Cellules dendritiques (CD)</b>	Maturation et activation des CD
<b>PNE (cellule présentatrice d'Ag) / TLc</b>	<i>Polarisation TH2</i> Activation, prolifération des TLc. <i>Polarisation TH2</i>
<b>PNE ( CCL17,CCL22) / Lymphocytes TH2</b>	<i>Recrutement des TH2</i>
<b>PNE / Lymphocytes B (BLc)</b>	Production d'anticorps de classe IgM
<b>PNE (APRIL, IL-6) / Plasmocytes</b>	Survie médullaire des plasmocytes
<b>PNE (MBP, ECP,EPO) / Mastocytes</b>	Survie et Activation des mastocytes
Mastocytes et TH2 (IL-25) / ILC-2	<i>Polarisation TH2</i>
Mastocytes / PNEs	Activation des PNEs
<b>PNE ( IL-4, IL-13)/ Macrophages (M)</b>	Polarisation M <sub>2</sub>
Macrophage (YM1) / PNEs	Recrutement des PNEs
<b>PNE (MBP) / Polynucléaires neutrophiles (PNN)</b>	Activation du métabolisme oxydatif production d'IL-8
<b>PNE (IL-5)</b>	<i>Polarisation TH2</i>

Tableau II : HEs secondaires

---

HEs « réactionnelles »\*

- Allergie : Asthme, rhinite allergique, dermatite atopique
- Parasitoses : Surtout les helminthoses
- Cancers :
  - Tumeurs solides : « Tumor Associated Tissue Eosinophilia » ou TATE
  - Leucémies aigüe (LA) lymphoblastique : LAL t (5 ; 14) (q31 ; q32) ; LA (HTLV-1)
  - Maladie de Hodgkin,
  - Lymphomes non hodgkiniens,
  - Lymphomes T épidermotropes,
  - Lymphome Angio Immunoblastique (LAI)
  - Mastocytose systémique (mutation D 816V de KIT)
- Médicaments: de l'HE isolée au DRESS (« Drug Reaction with Eosinophilia and Systemic Symptoms »)
- Le variant lymphoïde du SHE

HEs « d'accompagnement »\*\*

- Entités pathologiques et HE (différents contextes immunopathologiques)
  - Vascularites : granulomatose éosinophilique avec polyangéite ou « Churg et Strauss »
  - Maladies auto-immunes : pemphigoïde bulleuse, sclérodermie.
  - Réaction du Greffon contre l'hôte (GVH) chronique
  - Déficits immunitaires : syndrome Hyper IgE, syndrome d'Omenn
  - Angioœdème cyclique de Gleich.
  - Syndrome « myalgie-éosinophilie ».
- Pathologies d'organes et HEs (quelques exemples)
  - Poumon : Pneumonie à éosinophiles ou maladie de Carrington...
  - Fascia : syndrome de Shulman .
  - Appareil digestif : gastroentérite, oesophagite , pancréatite , hépatite à éosinophiles..
  - Dermatoses à éosinophiles : maladie de Kimura, folliculite d'Ofuji, cellulite de Wells...

---

\*Les causes ou les mécanismes à l'origine de l'HE sont ici clairement authentifiés

\*\*Les causes ou les mécanismes à l'origine de l'HE sont ici hypothétiques ou inconnus

### Tableau III : HEs primitives

---

#### HEs dans un cadre nosologique authentifié

- Leucémie Myéloïde Chronique (LMC) : t (9.22) (q34 ; q11) ; BCR-ABL ; Ph1
- LAM 4 Eo : inversion du chromosome 6
- Leucémie Myélo Monocytaire Chronique (LMMC) avec HE: t (5 ; 12) (q31 -33,p13) ; ETV6-PDGFRB

#### HEs dans le cadre de SMPs mal étiquetés : recherche de réarrangements rares

- Du PDGFRB : exemples
  - ETV6-PDGFRB la moins rare (déjà cité : LMMC avec HE ou HE avec SMP mal étiqueté)
  - Autres exemples plus rares [56]
- Du FGFR1 : exemples
  - ZNF198-FGFR1 ; t(8,13) (p11,q12) : syndrome 8 p11-12 ou « Stem Cell leukemia lymphoma »
  - Autres exemples plus rares [56]
- Du PDGFRA : exemples
  - BCR-PDGFRA t (4 ; 22) (q12 ; q11)
  - ETV6-PDGFRA t (4 ; 12) (q12 ; p13)
  - Autres exemples plus rares [56]

#### Variant myéloïde du SHE : recherche du réarrangement le plus fréquent

- Du PDGFRA : FIP1L1-PDGFRA : del (4) (q12 ; q12) : leucémie chronique à éosinophiles
-

Tableau IV: Classification OMS des proliférations myéloïdes malignes et des HEs

---

Syndromes myéloprolifératifs (SMP)

Leucémie Myéloïde Chronique (LMC)

Leucémie Chronique à Neutrophiles (LCN)

Polyglobulie de Vaquez ou Maladie de Vaquez

Myélofibrose Primitive (MFP)

Thrombocyémie essentielle (TE)

***Leucémie chronique à éosinophiles (LCE)***

Mastocytoses

Syndromes myéloprolifératifs inclassables

**Syndromes myélo et lympho-prolifératifs associés à une hyperéosinophilie et des anomalies affectant PDGFRA, PDGFRB ou FGFR1**

***Syndromes myélo et lympho-prolifératifs associés à un réarrangement de PDGFRA***

***Syndromes myélo et lympho-prolifératifs associés à un réarrangement de PDGFRB***

***Syndromes myélo et lympho-prolifératifs associés à une anomalie de FGFR1***

---

## Références bibliographiques :

1. Butterworth AE, Sturrock RF, Houba V, et al Sher A, Rees PH. Eosinophils as mediators of antibody-dependent damage to schistosomula. *Nature*. 1975;256(5520):727-729.
2. Chusid MJ, Dale DC, West BC, et al. The hypereosinophilic syndrome: analysis of fourteen cases with review of the literature. *Medicine (Baltimore)*. 1975;54(1):1-27.
3. Jacobsen EA, Helmers RA, Lee JJ, et al. The expanding role(s) of eosinophils in health and disease. *Blood*. 2012;120(19):3882-3890.
4. Chu VT, Fröhlich A, Steinhauser G, et al. Eosinophils are required for the maintenance of plasma cells in the bone marrow. *Nat Immunol*. 2011;12(2):151-159.
5. Chu VT, Berek C. Immunization induces activation of bone marrow eosinophils required for plasma cell survival. *Eur J Immunol*. 2012;42(1):130-137.
6. Willetts L, Parker K, Wesselius LJ, et al. Immunodetection of occult eosinophils in lung tissue biopsies may help predict survival in acute lung injury. *Respir Res*. 2011;12:116.
7. Protheroe C, Woodruff SA, de Petris G, et al. A novel histologic scoring system to evaluate mucosal biopsies from patients with eosinophilic esophagitis. *Clin Gastroenterol Hepatol Off Clin Pract J Am Gastroenterol Assoc*. 2009;7(7):749-755.e11.
8. Ito W, Takeda M, Fujita M, et al. Hepatocyte growth factor suppresses production of reactive oxygen species and release of eosinophil-derived neurotoxin from human eosinophils. *Int Arch Allergy Immunol*. 2008;147(4):331-337.
9. Ochkur SI, Kim JD, Protheroe CA, et al. The development of a sensitive and specific ELISA for mouse eosinophil peroxidase: assessment of eosinophil degranulation ex vivo and in models of human disease. *J Immunol Methods*. 2012;375(1-2):138-147.
10. Wu W, Samoszuk MK, Comhair SA, et al. Eosinophils generate brominating oxidants in allergen-induced asthma. *J Clin Invest*. 2000;105(10):1455-1463.
11. Kahn J-E, Dutoit-Lefevre V, Duban-Deweir S, et al. Comparative proteomic analysis of blood eosinophils reveals redox signaling modifications in patients with FIP1L1-PDGFR $\alpha$ -associated chronic eosinophilic leukemia. *J Proteome Res*. 2011;10(4):1468-1480.
12. Mori Y, Iwasaki H, Kohno K, et al. Identification of the human eosinophil lineage-committed progenitor: revision of phenotypic definition of the human common myeloid progenitor. *J Exp Med*. 2009;206(1):183-193.
13. Rosenbauer F, Tenen DG. Transcription factors in myeloid development: balancing differentiation with transformation. *Nat Rev Immunol*. 2007;7(2):105-117.

14. Du J, Stankiewicz MJ, Liu Y, et al. Novel combinatorial interactions of GATA-1, PU.1, and C/EBPepsilon isoforms regulate transcription of the gene encoding eosinophil granule major basic protein. *J Biol Chem*. 2002;277(45):43481-43494.
15. Yu C, Cantor AB, Yang H, et al. Targeted deletion of a high-affinity GATA-binding site in the GATA-1 promoter leads to selective loss of the eosinophil lineage in vivo. *J Exp Med*. 2002;195(11):1387-1395.
16. Lee JJ, Dimina D, Macias MP, et al. Defining a link with asthma in mice congenitally deficient in eosinophils. *Science*. 2004;305(5691):1773-1776.
17. Foster PS, Hogan SP, Ramsay AJ, et al. Interleukin 5 deficiency abolishes eosinophilia, airways hyperreactivity, and lung damage in a mouse asthma model. *J Exp Med*. 1996;183(1):195-201.
18. Rothenberg ME, Hogan SP. The eosinophil. *Annu Rev Immunol*. 2006;24:147-174.
19. Lamousé-Smith ESN, Furuta GT. Eosinophils in the gastrointestinal tract. *Curr Gastroenterol Rep*. 2006;8(5):390-395.
20. Bisgaard H, Li N, Bonnelykke K, et al. Reduced diversity of the intestinal microbiota during infancy is associated with increased risk of allergic disease at school age. *J Allergy Clin Immunol*. 2011;128(3):646-652.e1-5.
21. Wong CK, Hu S, Cheung PFY, et al. Thymic stromal lymphopoietin induces chemotactic and prosurvival effects in eosinophils: implications in allergic inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2010;43(3):305-315.
22. Matsuba-Kitamura S, Yoshimoto T, Yasuda K, et al. Contribution of IL-33 to induction and augmentation of experimental allergic conjunctivitis. *Int Immunol*. 2010;22(6):479-489.
23. Neill DR, Wong SH, Bellosi A, et al. Nuocytes represent a new innate effector leukocyte that mediates type-2 immunity. *Nature*. 2010;464(7293):1367-1370.
24. Mjösberg JM, Trifari S, Crellin NK, et al. Human IL-25- and IL-33-responsive type 2 innate lymphoid cells are defined by expression of CCR4 and CD161. *Nat Immunol*. 2011;12(11):1055-1062.
25. Munitz A, Levi-Strauss F. Eosinophils: « new » roles for « old » cells. *Allergy*. 2004;59(3):268-275.
26. Blanchard C, Rothenberg ME. Biology of the eosinophil. *Adv Immunol*. 2009;101:81-121.
27. Melo RCN, Weller PF. Piecemeal degranulation in human eosinophils: a distinct secretion mechanism underlying inflammatory responses. *Histol Histopathol*. 2010;25(10):1341-1354.
28. Yousefi S, Gold JA, Andina N, et al. Catapult-like release of mitochondrial DNA by eosinophils contributes to antibacterial defense. *Nat Med*. 2008;14(9):949-953.
29. Nutten S, Papin JP, Woerly G, et al. Selectin and Lewis(x) are required as co-receptors in antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity of human eosinophils to *Schistosoma mansoni* schistosomula. *Eur J Immunol*. 1999;29(3):799-808.
30. Gleich GJ. The eosinophil and bronchial asthma: current understanding. *J Allergy Clin Immunol*. 1990;85(2):422-436.

31. Swartz JM, Dyer KD, Cheever AW, et al. *Schistosoma mansoni* infection in eosinophil lineage-ablated mice. *Blood*. 2006;108(7):2420-2427.
32. Sasaki O, Sugaya H, Ishida K, et al. Ablation of eosinophils with anti-IL-5 antibody enhances the survival of intracranial worms of *Angiostrongylus cantonensis* in the mouse. *Parasite Immunol*. 1993;15(6):349-354.
33. Sher A, Coffman RL, Hieny S, et al. Ablation of eosinophil and IgE responses with anti-IL-5 or anti-IL-4 antibodies fails to affect immunity against *Schistosoma mansoni* in the mouse. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1990;145(11):3911-3916.
34. Fabre V, Beiting DP, Bliss SK, et al. Eosinophil deficiency compromises parasite survival in chronic nematode infection. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2009;182(3):1577-1583.
35. Eriksson J, Reimert CM, Kabatereine NB, et al. The 434(G>C) polymorphism within the coding sequence of Eosinophil Cationic Protein (ECP) correlates with the natural course of *Schistosoma mansoni* infection. *Int J Parasitol*. 2007;37(12):1359-1366.
36. Haldar P, Brightling CE, Hargadon B, et al. Mepolizumab and exacerbations of refractory eosinophilic asthma. *N Engl J Med*. 2009;360(10):973-984.
37. Nair P, Pizzichini MMM, Kjarsgaard M, et al. Mepolizumab for prednisone-dependent asthma with sputum eosinophilia. *N Engl J Med*. 2009;360(10):985-993.
38. Gatault S, Legrand F, Delbeke M, et al. Involvement of eosinophils in the anti-tumor response. *Cancer Immunol Immunother CII*. 2012;61(9):1527-1534.
39. Wang H-B, Weller PF. Pivotal advance: eosinophils mediate early alum adjuvant-elicited B cell priming and IgM production. *J Leukoc Biol*. 2008;83(4):817-821.
40. Chawla A, Nguyen KD, Goh YPS. Macrophage-mediated inflammation in metabolic disease. *Nat Rev Immunol*. 2011;11(11):738-749.
41. Timmons BC, Fairhurst A-M, Mahendroo MS. Temporal changes in myeloid cells in the cervix during pregnancy and parturition. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2009;182(5):2700-2707.
42. Gouon-Evans V, Rothenberg ME, Pollard JW. Postnatal mammary gland development requires macrophages and eosinophils. *Dev Camb Engl*. 2000;127(11):2269-2282.
43. Jacobsen EA, Ochkur SI, Pero RS, et al. Allergic pulmonary inflammation in mice is dependent on eosinophil-induced recruitment of effector T cells. *J Exp Med*. 2008;205(3):699-710.
44. Jacobsen EA, Zellner KR, Colbert D, et al. Eosinophils regulate dendritic cells and Th2 pulmonary immune responses following allergen provocation. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2011;187(11):6059-6068.
45. Webb DC, McKenzie AN, Foster PS. Expression of the Ym2 lectin-binding protein is dependent on interleukin (IL)-4 and IL-13 signal transduction: identification of a novel allergy-associated protein. *J Biol Chem*. 2001;276(45):41969-41976.

46. Yang D, Chen Q, Su SB, et al. Eosinophil-derived neurotoxin acts as an alarmin to activate the TLR2-MyD88 signal pathway in dendritic cells and enhances Th2 immune responses. *J Exp Med*. 2008;205(1):79-90.
47. Shi H-Z. Eosinophils function as antigen-presenting cells. *J Leukoc Biol*. 2004;76(3):520-527.
48. Wang H-B, Ghiran I, Matthaei K, et al. Airway eosinophils: allergic inflammation recruited professional antigen-presenting cells. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2007;179(11):7585-7592.
49. Spencer LA, Szela CT, Perez SAC, et al. Human eosinophils constitutively express multiple Th1, Th2, and immunoregulatory cytokines that are secreted rapidly and differentially. *J Leukoc Biol*. 2009;85(1):117-123.
50. Driss V, Legrand F, Hermann E, et al. TLR2-dependent eosinophil interactions with mycobacteria: role of alpha-defensins. *Blood*. 2009;113(14):3235-3244.
51. Lotfi R, Lee JJ, Lotze MT. Eosinophilic granulocytes and damage-associated molecular pattern molecules (DAMPs): role in the inflammatory response within tumors. *J Immunother Hagerstown Md* 1997. 2007;30(1):16-28.
52. Terrier B, Bièche I, Maisonobe T, et al. Interleukin-25: a cytokine linking eosinophils and adaptive immunity in Churg-Strauss syndrome. *Blood*. 2010;116(22):4523-4531.
53. Ogbogu PU, Bochner BS, Butterfield JH, et al. Hypereosinophilic syndrome: a multicenter, retrospective analysis of clinical characteristics and response to therapy. *J Allergy Clin Immunol*. 2009;124(6):1319-1325.e3.
54. Rothenberg ME, Spergel JM, Sherrill JD, et al. Common variants at 5q22 associate with pediatric eosinophilic esophagitis. *Nat Genet*. 2010;42(4):289-291.
55. Butterfield JH, Leiferman KM, Gleich GJ. Nodules, eosinophilia, rheumatism, dermatitis and swelling (NERDS): a novel eosinophilic disorder. *Clin Exp Allergy J Br Soc Allergy Clin Immunol*. 1993;23(7):571-580.
56. Gotlib J. World Health Organization-defined eosinophilic disorders: 2012 update on diagnosis, risk stratification, and management. *Am J Hematol*. 2012;87(9):903-914.
57. Bain BJ. Relationship between idiopathic hypereosinophilic syndrome, eosinophilic leukemia, and systemic mastocytosis. *Am J Hematol*. 2004;77(1):82-85.
58. Macdonald D, Reiter A, Cross NCP. The 8p11 myeloproliferative syndrome: a distinct clinical entity caused by constitutive activation of FGFR1. *Acta Haematol*. 2002;107(2):101-107.
59. Ollendorff V, Guasch G, Isnardon D, et al. Characterization of FIM-FGFR1, the fusion product of the myeloproliferative disorder-associated t(8;13) translocation. *J Biol Chem*. 1999;274(38):26922-26930.
60. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*. 2009;114(5):937-951.



61. Cools J, DeAngelo DJ, Gotlib J, et al. A tyrosine kinase created by fusion of the PDGFRA and FIP1L1 genes as a therapeutic target of imatinib in idiopathic hypereosinophilic syndrome. *N Engl J Med*. 2003;348(13):1201-1214.
62. Roufosse F, Cogan E, Goldman M. Lymphocytic variant hypereosinophilic syndromes. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2007;27(3):389-413.
63. Roufosse F, Schandené L, Sibille C, et al. Clonal Th2 lymphocytes in patients with the idiopathic hypereosinophilic syndrome. *Br J Haematol*. 2000;109(3):540-548.
64. Rothenberg ME, Klion AD, Roufosse FE, et al. Mepolizumab HES Study Group. Treatment of patients with the hypereosinophilic syndrome with mepolizumab. *N Engl J Med*. 2008;358(12):1215-1228.
65. Roufosse F, de Lavareille A, Schandené L, et al. Mepolizumab as a corticosteroid-sparing agent in lymphocytic variant hypereosinophilic syndrome. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;126(4):828-835.e3.
66. Simon H-U, Rothenberg ME, Bochner BS, et al. Refining the definition of hypereosinophilic syndrome. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;126(1):45-49.
67. Valent P, Klion AD, Horny H-P, et al. Contemporary consensus proposal on criteria and classification of eosinophilic disorders and related syndromes. *J Allergy Clin Immunol*. 2012;130(3):607-612.e9.
68. Legrand F, Renneville A, Macintyre E, et al, on behalf of the French Eosinophil Network. The Spectrum of FIP1L1-PDGFR-Associated Chronic Eosinophilic Leukemia: New Insights Based on a Survey of 44 Cases. *Medicine (Baltimore)*. 2013;

## Abréviations

---

APRIL	A Proliferation-Inducing Ligand
CCL	CC-Chemokine Ligand
CCR	CC-Chemokine Receptor
DAMPs	Damage Associated Molecular Patterns
DIGE	Differential in Gel Electrophoresis
ECP	Eosinophil Cationic Protein
EDN	Eosinophil-Derived Neurotoxin
EET	Eosinophil Extracellular Traps
EPO	Eosinophil Peroxidase
FGF	Fibroblast Growth Factor
FISH	Fluorescence in-situ Hybridization
HE, HEs	Hypereosinophilie (s)
HMGB1	High Mobility Group Protein B1
IL	Interleukine
ILC	Innate lymphoid cells
JAK	Janus Kinases
LFA	Lymphocyte Function Antigens LFA ( $\beta$ 2-integrines)
LT	Leucotrienes
MadCAM-1	Mucosal adressin Cell Adhesion Molecule 1
MBP	Major Basic Protein
NGF	Nerve Growth Factor
PAF	platelet-activating-factor
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PGD	Prostaglandines
PNE	Polynucléaire Eosinophile
PRRs	Pattern Recognition Receptors
SHE	Syndrome Hypereosinophilique
SIGLEC	Sialic acid/binding Immunoglobulin like lectin 8
SMD	Syndrome Myelodysplasique
SMP	Syndrome Myeoloproliferatif
STAT	Signal Transducer and Activators of Transcription
TSLP	Thymic Stromal Lymphopoietin
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VLA	Very Late Antigens ( $\beta$ 1-integrines)

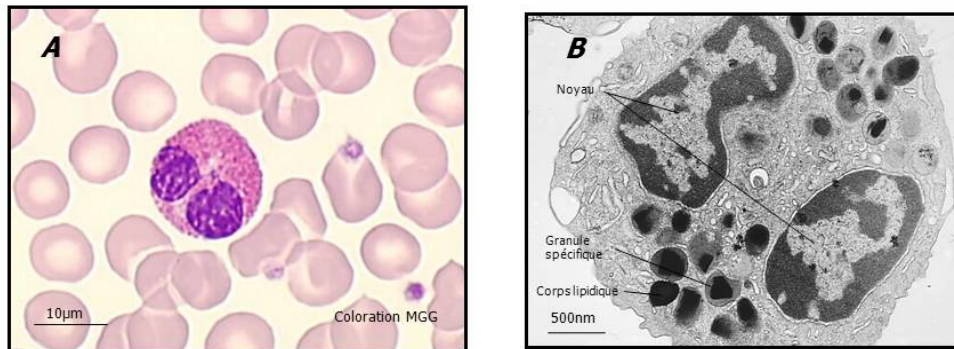


Figure 1

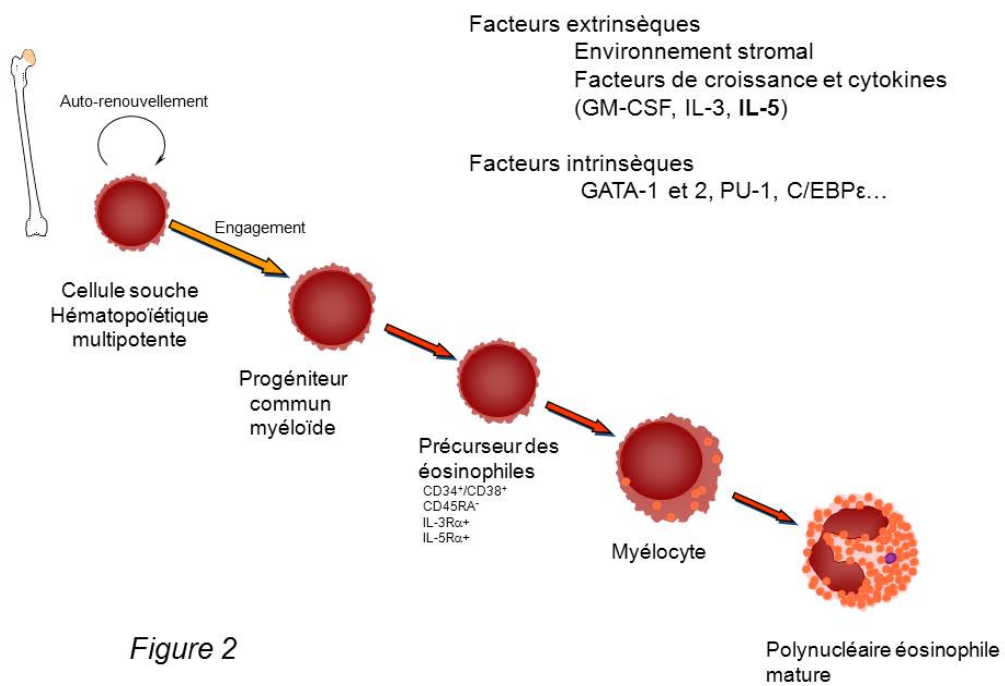


Figure 2

Cytokines et médiateurs de la  
réponse inflammatoire

Chimiokines

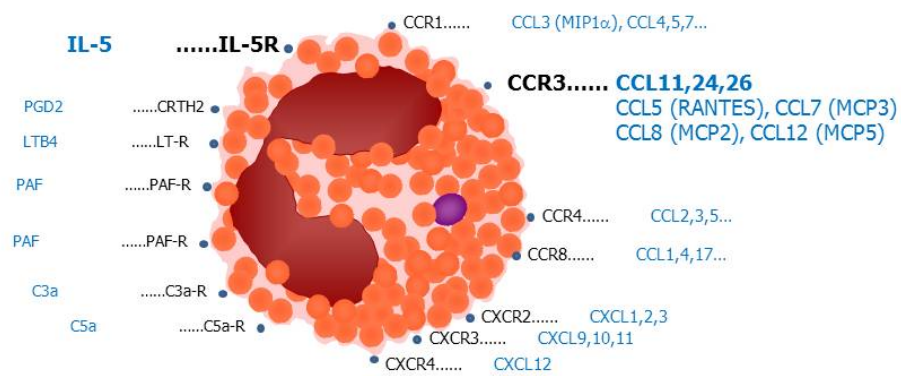


Figure 3

Échanges sucres - adhésines - sélectines

Intégrines

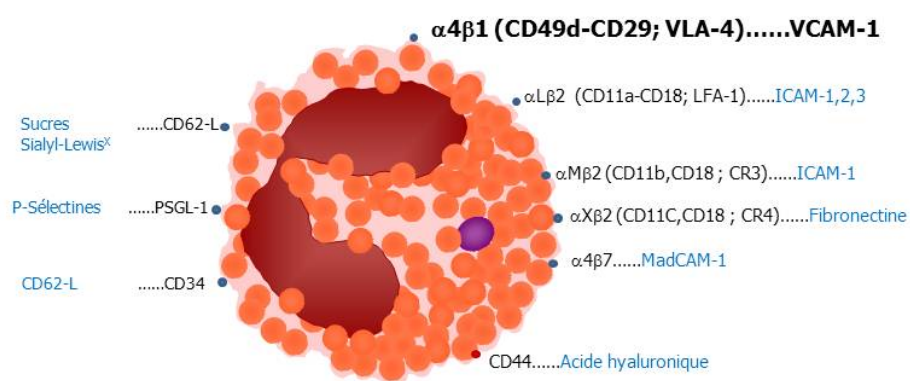
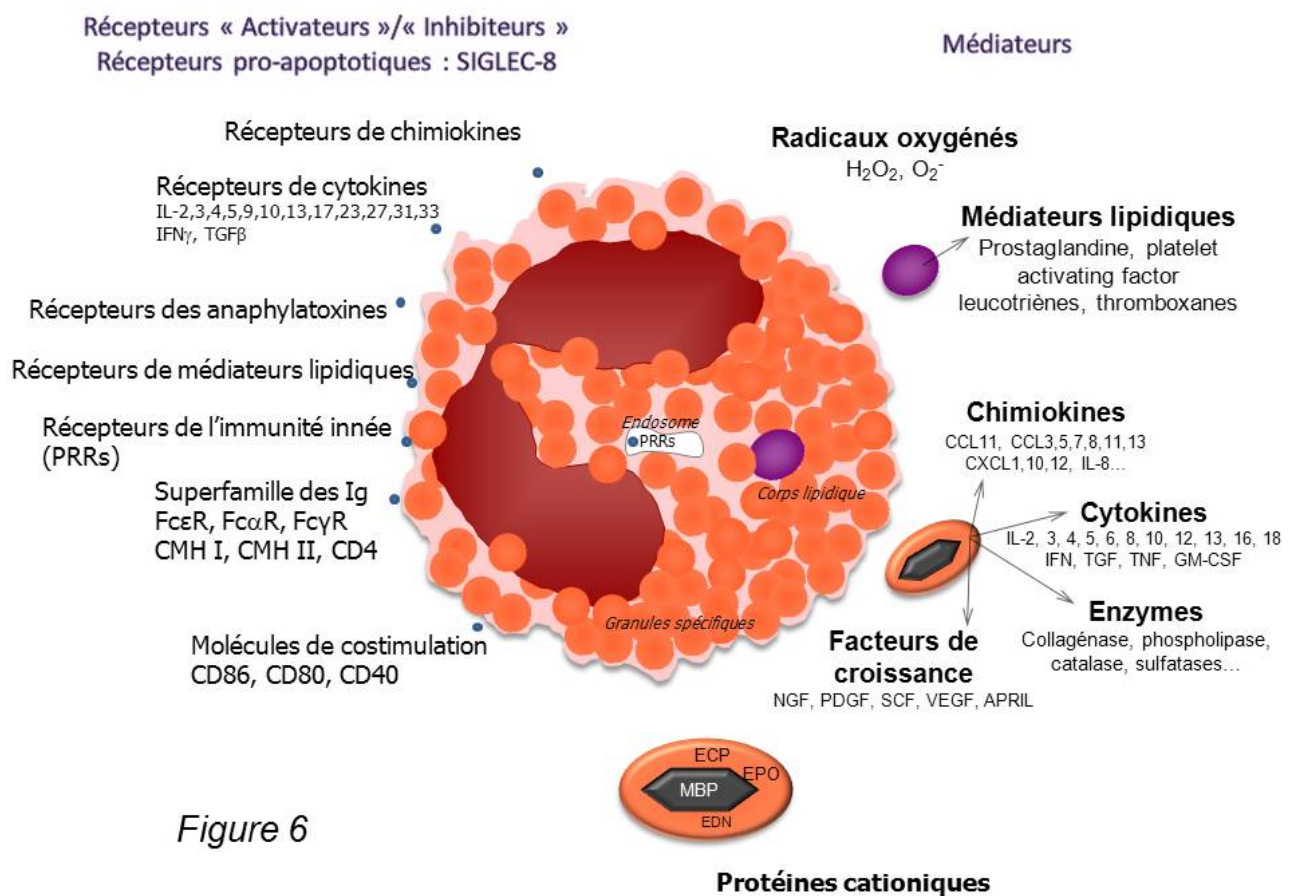
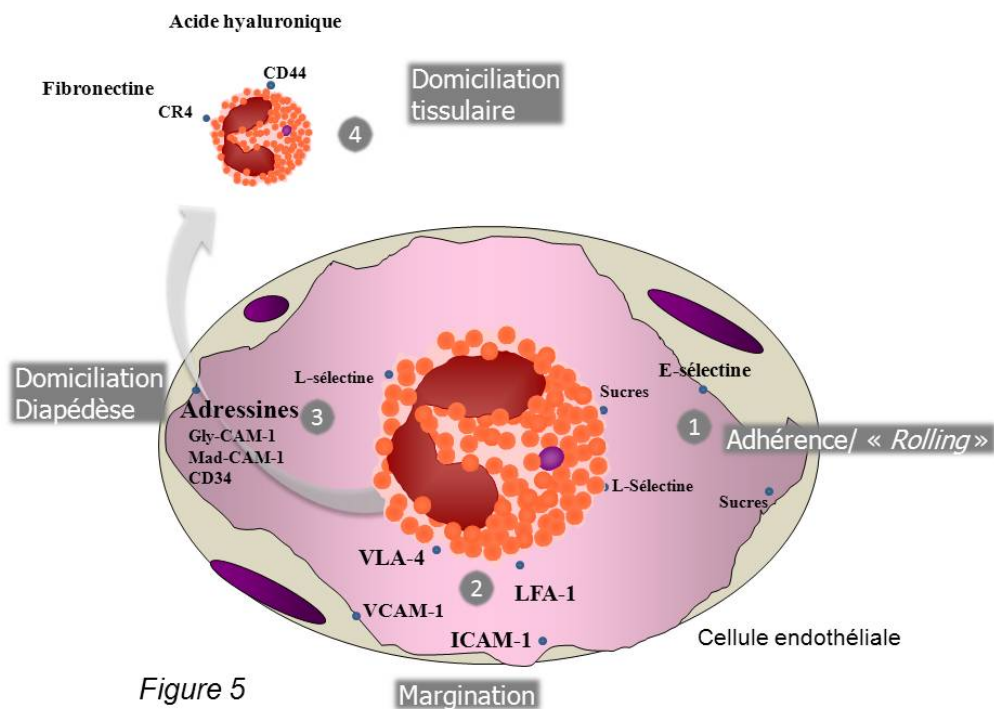
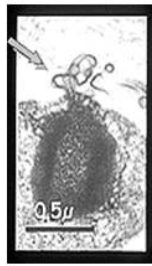
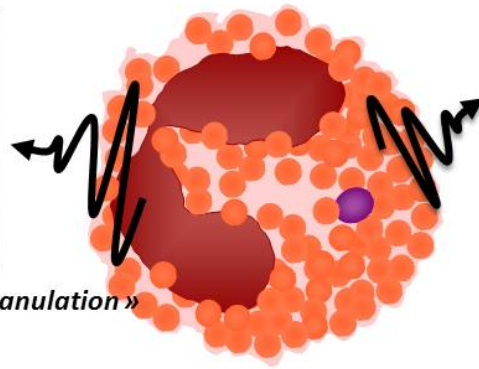


Figure 4





« Piecemeal degranulation »



Enzymes  
Chimiokines  
Cytokines  
Facteurs de croissance  
Radicaux oxygénés  
Médiateurs lipidiques  
**Protéines cationiques**

Épithélium

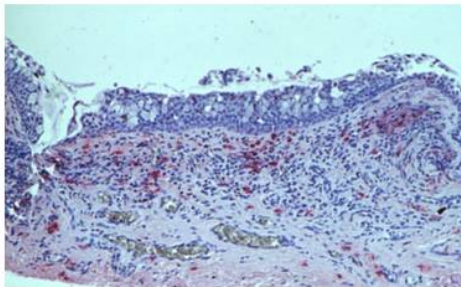
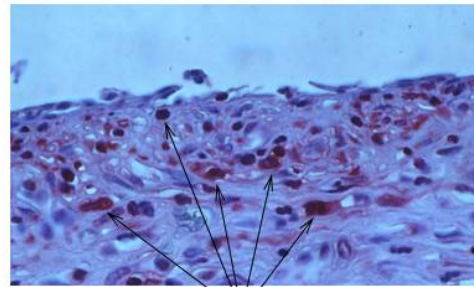


Figure 7

Abrasion épithéliale



Afflux de PNE  
(immunomarquage EDN)

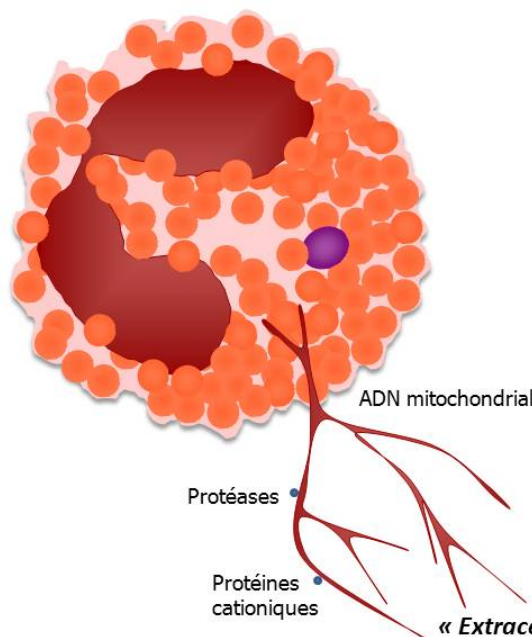


Figure 8

« Extracellular trap formation »

Les polynucléaires éosinophiles sont des leucocytes multifonctionnels qui participent à la réponse innée et adaptative par l'expression et la sécrétion de nombreux récepteurs et médiateurs. De plus en plus d'études, épidémiologiques, *in vivo* ou *in vitro*, suggèrent la participation des éosinophiles dans l'immunité anti-tumorale, et notamment dans le contexte du cancer du côlon. En effet, la présence d'une TATE (Tumor-Associated Tissue Eosinophilia) chez les sujets atteints de cancers est, en général, associée à un pronostic favorable. De même, notre laboratoire ainsi que d'autres équipes ont montré que les éosinophiles humains expriment des récepteurs et médiateurs, communs aux lymphocytes et connus pour être impliqués dans l'immunité anti-tumorale, tels que le 2B4, le complexe CD3/TCR $\gamma\delta$  ou le granzyme A. La stimulation des éosinophiles *in vitro*, via ces récepteurs, conduit à la mort de cellules cancéreuses, cet effet nécessitant un contact entre les cellules impliquant LFA-1 sur les éosinophiles.

L'interleukine-18 est un membre de la famille des cytokines de l'IL-1. Elle fut initialement identifiée comme un facteur induisant la production d'IFN $\gamma$ , basé sur sa capacité à promouvoir une réponse de type Th1 chez les lymphocytes et les cellules NK. Aujourd'hui, l'IL-18 est considérée comme une cytokine immuno-régulatrice capable de stimuler de nombreux types cellulaires. Son implication dans la réponse anti-tumorale est de plus en plus reconnue, notamment en participant à la cytotoxicité des cellules NK. Nous avons donc étudié si cette cytokine pouvait également être impliquée dans la cytotoxicité des éosinophiles.

Dans ce travail, nous avons démontré que les éosinophiles humains exercent une cytotoxicité vis-à-vis de plusieurs lignées cellulaires tumorales avec cependant une certaine hétérogénéité. L'IL-18 est non seulement capable d'activer *in vitro* les éosinophiles mais elle participe également à leur activité anti-tumorale vis-à-vis d'une lignée de carcinome du côlon, les Colo-205, en augmentant notamment le contact entre les deux types cellulaires. Nos résultats proposent l'IL-18 comme un nouveau médiateur dans l'activité anti-tumorale des éosinophiles et apportent un argument supplémentaire en faveur du rôle bénéfique que les éosinophiles peuvent exercer, notamment dans le contexte du cancer du côlon.